

Université de Montréal

**La régulation de l'hepcidine  
à travers les récepteurs Toll-like dans les macrophages**

Par

Antonio Layoun

Département de microbiologie et immunologie  
Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures en  
vue de l'obtention du grade de maîtrise  
en microbiologie et immunologie

Décembre 2009

© Antonio Layoun, 2009

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :  
La régulation de l'hepcidine à travers les récepteurs Toll-like dans les macrophages

Présentée par :  
Antonio Layoun

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

D<sup>r</sup> Marika Sarfati, président-rapporteur  
D<sup>r</sup> Manuela Santos, directeur de recherche  
D<sup>r</sup> Janos G. Filep, membre du jury

## Résumé

L'interaction entre le système immunitaire et le métabolisme du fer est bien illustrée par l'anémie des maladies chroniques (ACD), qui est fréquemment rencontrée dans les infections chroniques, l'inflammation et le cancer. La majorité des modifications dans les paramètres du fer observées dans l'ACD tient compte des modifications de l'homéostasie du fer, avec la délocalisation du métal de la circulation et les sites de l'érythropoïèse au compartiment de stockage dans les macrophages. Les mécanismes de la réponse hyposidérémique impliquent des cytokines, notamment TNF-alpha et IL-6, qui régulent les niveaux de plusieurs gènes du métabolisme du fer, y compris les transporteurs de fer et de l'hepcidine, un régulateur négatif de l'absorption du fer, ce qui entraîne l'inhibition de l'exportation du fer à travers la ferroportine 1 (FPN1) au niveau de l'intestin et les macrophages. Des études antérieures ont montré que l'IL-6 induit l'expression d'hepcidine dans les hépatocytes, mais il y a très peu de données concernant la façon par laquelle l'hepcidine et la FPN1 sont régulées dans les macrophages. Récemment, nous avons constaté que l'induction de l'hepcidine dans le foie par le lipopolysaccharide (LPS) dépend de la voie de signalisation médiée par le récepteur Toll-like 4 (TLR4). Le but de ce travail est d'identifier les ligands des TLRs capables d'induire l'hepcidine dans les macrophages et de déterminer l'exigence des TLRs dans l'induction de l'hepcidine et le développement d'hyposidérémie. En plus, nous voulons étudier l'effet de l'inflammation causée par les ligands des TLRs sur le taux de fer sérique, la production des cytokines et l'expression de l'hepcidine et de la ferroportine. D'autre part nous voulons étudier l'effet du taux du fer sur la production d'IL-6 macrophagique en réponse à la stimulation par le TLR4. D'abord, pour identifier les ligands des TLRs capables d'induire l'hepcidine dans les macrophages, nous avons traité les macrophages RAW 264.7 et les macrophages péritonéaux de souris (MPMs) avec différents ligands TLRs et on a mesuré l'expression de l'hepcidine par qRT-PCR. Nous avons observé que Pam3CSK4 (Pam), un ligand de TLR2/1; LPS, un ligand de TLR-4 et FSL1 un ligand de TLR2/6 induisent l'expression de l'hepcidine dans les cellules RAW 264.7 et les MPMs, contrairement au polyinosinic: polycytidylic acid (Poly I: C), un ligand de TLR3. De plus, LPS était capable de réprimer l'expression de la ferroportine dans les cellules RAW 264.7. Afin de mieux définir la nécessité des TLRs pour assurer cette expression, nous avons utilisé les souris TLR-2 knock-out et on a établi que l'expression de l'hepcidine dans les macrophages par LPS, Pam ou FSL1 est dépendante du TLR2. En accord avec les expériences *in vitro*, les études effectuées *in vivo* ont montré que LPS réprime l'expression de la ferroportine, ainsi que PolyI:C n'est pas capable de stimuler l'expression d'hepcidine hépatique, par contre il était efficace pour déclencher une hyposidérémie. Ensuite, on voulait déterminer la voie de signalisation utilisée dans l'induction de l'hepcidine dans les macrophages. Comme il y a deux voies majeures connues pour la signalisation des TLRs : une dépendante et l'autre indépendante de la protéine MyD88, on a étudié l'expression de l'hepcidine dans les MPMs isolés des souris MyD88<sup>-/-</sup> et nous avons constaté que l'absence de signalisation MyD88 abolit l'induction de l'hepcidine déclenchée par Pam, LPS et FSL1. D'autre part, la stimulation avec du LPS induisait *in vivo* la production d'IL-6 et de TNF-alpha, et la stimulation d'IL-6 était renforcée *in vitro* par la présence du fer. Ces observations indiquent que l'expression de HAMP (Hepcidin Antimicrobial Peptide) dans les macrophages peut être régulée par différents TLRs, ce qui suggère que la production d'hepcidine macrophagique fait partie d'une réponse immunitaire activée par les TLRs.

**Mots Clés :** Inflammation, Fer, Hecidine, TLRs, PAMPs, Macrophages, Hyposidérémie.

## Abstract

The interaction between the immune system and iron metabolism is well exemplified in the anemia of chronic disease (ACD), which is frequently encountered in chronic infections, inflammation and cancer. The major changes in iron parameters observed in ACD ultimately reflect modifications in iron trafficking, with relocation of the metal from both the circulation and sites of erythropoiesis to the storage compartment in macrophages. Mechanisms in the hypoferremic response involve cytokines, including TNF- $\alpha$  and IL-6. These pro-inflammatory cytokines regulate the levels of several iron metabolism genes, including iron transporters and hepcidin, a negative regulator of iron absorption, resulting in the inhibition of iron export by ferroportin 1 (FPN1) from the intestine and macrophages. Previous studies showed that IL-6 upregulates hepcidin in hepatocytes, but there are very few data regarding how hepcidin and FPN1 expression is regulated in macrophages. More recently, we found that hepcidin induction in the liver by lipopolysaccharide (LPS) is dependent on the signaling pathway mediated by toll-like receptor 4 (TLR4). The aim of this work is to identify TLR ligands able to induce hepcidin in macrophages and to determine the requirement for TLRs in hepcidin expression and the development of hypoferremia. In addition, we want to study the effect of inflammation induced by TLR ligands on serum iron levels, cytokine production, hepcidin and ferroportin expression. On the other hand we want to study the effect of iron levels on IL-6 production by macrophages in response to TLR4 stimulation. First, to identify TLR ligands capable of inducing hepcidin in macrophages, we treated Raw 264.7 macrophages and thioglycollate-stimulated mouse peritoneal macrophages (MPMs) with various TLR ligands and measured hepcidin and ferroportin expression by real-time RT-PCR. We observed that Pam3CSK4 (Pam), a TLR1/2 ligand; LPS, a TLR-4 ligand; and FSL1 a TLR6/2 ligand, but not polyinosinic: polycytidylic acid (poly I:C), a TLR3 ligand, upregulate hepcidin expression in both Raw 264.7 cells and MPMs. Furthermore, LPS was able to repress ferroportin expression in RAW 264.7 macrophages. To further define the requirement for the identified TLRs, we used TLR-2 knockout mice and established that upregulation of macrophage hepcidin expression by Pam or FSL1 is TLR2 dependent, respectively. In agreement with the *in vitro* experiments, when tested *in vivo* LPS repressed ferroportin expression and polyI:C failed to induce hepatic hepcidin expression but was effective in triggering hypoferremia. We next investigated whether MyD88, the predominant but not exclusive intracellular signal transduction pathway for TLR-4, is necessary for hepcidin induction in macrophages. Using MyD88 knockout mice, we found that the absence of MyD88 signaling abolishes hepcidin induction triggered by Pam, LPS and FSL1. On the other hand, stimulation with LPS induced *in vivo* the production of IL-6 and TNF- $\alpha$ , and IL-6 stimulation was enhanced *in vitro* by high amount of iron in macrophages. These observations indicate that HAMP (Hepcidin Antimicrobial Peptide) expression in macrophages can be regulated through multiple TLRs, suggesting that macrophage hepcidin production is part of an immune response activated by the TLRs.

**Keywords:** Inflammation, Iron, Hepcidin, TLRs, PAMPs, Macrophages, hypoferremia.

## Liste des abréviations

8-OHG : Acide nucléique 8-hydroxyguanine

ACD : Anémie des maladies inflammatoires chroniques

ADN: Acide désoxyribonucléique

Apo-Tf : Apotransferrine

AP1 : Activator protein 1

ARN : Acide ribonucléique

ATPase: Adénosine triphosphatase

BDH-2/3 : Beta-défensine humaine 2/3

BMP-RE : BMP-responsive elements

BMPRs : Bone morphogenetic protein receptors

BSA : Bovine serum albumin

CAT : Catalase

CCPA : Conseil canadien de protection des animaux

CD : Cellules dendritiques

CD163 : Cluster of differentiation 163

CIPA : Comité institutionnel de protection des animaux

CMH1 : Complexe majeur d'histocompatibilité de classe 1

CP : Céruloplasmine

CPA : Cellules présentatrices d'antigène

CpG : Cytosine-guanine

CTFF : Capacité totale de fixation du fer

CYBRD1 : Cytochrome b réductase 1

Db : Doubles brins

DD : Death domain

DTT : Dithiotreitol

DFO : Desferrioxamine

DMEM : Dubelcco's modified eagle medium

ECP : Eosinophil cationic protein

EPO : Erythropoïétine

FAC : Ferric Ammonium Citrate  
FACS : Cytométrie en flux  
FBS : Fetal bovine serum  
Fe-S : Clusters fer-soufre  
FIH : Facteurs inductibles par l'hypoxie  
FPN1 : Ferroportine1  
FS : Fer sérique  
FTH : Ferritin heavy chain  
GADD45 : Growth Arrest and DNA-Damage Inducible 45 Gene  
GDF15 : Growth differentiation factor 15  
GPI : Glycosylphosphatidylinositol  
GPL : Lipophosphoglycane  
GPx : Glutathione peroxydase  
HEPHA : Hephaestine  
HAMP : Hepcidin Antimicrobial Peptide  
Hb : Hémoglobine  
HCP1 : Hème Carrier Protein 1  
HH : Hémochromatose héréditaire  
HJV : Hémojuvéline  
HJVm : Hémojuvéline membranaire  
HJVs : Hémojuvéline soluble  
HO-1 : Hème oxygénase 1  
Hp : Haptoglobine  
HSV : Herpès simplex virus  
i.p. : Intrapéritonéale  
IFNs : Interférons  
IL1  $\beta$  : Interleukine 1 beta  
IL-6 : Interleukine 6  
IMP : Integrin-Mobilferrin Pathway  
IRAK : IL-1 Receptor-Associated Kinase

IRE : Iron responsive elements  
IRF3 : Interferon regulatory factor 3  
IRP1 : Iron regulatory proteins 1  
IRP2 : Iron regulatory proteins 2  
LAM : Lipoarabinomannanes  
LB : Lymphocytes B  
LIP : Labile iron pool  
Lipocaline 2: LCN2  
LOXs : Lipoxygénases  
LPS : Lipopolysaccharide  
LRR : Leucine rich repeats  
LT : Lymphocytes T  
MAP kinases: Mitogen-activated protein kinases  
MCMV : Cytomégalo virus murin  
MFI : Mean fluorescence intensity  
MMTV : Tumeur mammaire murines  
MPMs : Macrophages péritonéaux murins  
NaN<sub>3</sub>: Sodium Azide  
NF-κB : Nuclear factor κB  
NK : Natural killer  
NRAMP : Natural resistance-associated macrophage protein  
NTBI : Non transferrin bound iron  
O<sub>2</sub><sup>••</sup>: Superoxyde  
p53 : Tumor protein 53  
PAMPs : Pathogen associated molecular patterns  
PBS : Phosphate-buffered saline  
Poly(I:C) : Polyinosine-polycytidylic acid  
PRRs : Pattern-recognition receptors  
PS : Peniciline et Streptomycine  
RE : Réticulum endoplasmique

RNRs : Ribonucléotides réductases  
RO<sup>•</sup> : Alcoxy radical  
ROI : Reactive oxygen intermediates  
ROO<sup>•</sup> : Alkyl oxyradical  
ROOH : Hydroxy peroxydes des lipides  
RT : Reverse transcription  
SDS : Sodium dodecyl sulfate  
Sb : Simples brins  
SOD : Superoxide dismutase  
Steap3: Six-transmembrane epithelial antigen of the prostate 3  
ST% : Saturation de la transferrine  
sTfR1 : Récepteur de la transferrine 1 soluble  
Tf : Transferrine  
TfR : Récepteur de la transferrine  
TfR2 : Transferrine 2  
TGF- $\beta$  : Transforming growth factor  $\beta$   
TH : LT Helper  
TIR : Toll/IL-1 receptor  
TLR4 : Récepteur Toll-like 4  
TLRs : Toll-like receptors  
TNF- $\alpha$  : Facteur nécrose tumorale  $\alpha$   
UNC93B1 : Unc-93 Homolog B1  
USF2 : Upstream transcription factor 2  
UTR : Untranslated regions  
VRS : Virus respiratoire syncytial



## Table des matières

I. INTRODUCTION.....	1
1. Propriétés chimiques et fonctions biologiques du fer .....	3
1.1 Les hémoprotéines.....	4
1.2 Les protéines fer-soufre.....	5
1.3 Autres protéines contenant du fer.....	6
1.4 Protéines liant le fer.....	8
2. Toxicité du fer.....	9
3. Homéostasie cellulaire du fer.....	11
3.1 Captation du fer.....	11
3.2 Capture cellulaire du fer par des mécanismes dépendants de la Transferrine...11	
3.2.1 Récepteur de la transferrine (TfR).....	11
3.2.2 Cycle de la transferrine.....	13
3.3 Capture cellulaire du fer par des mécanismes indépendants de la Tf .....	15
3.4 Devenir du fer cellulaire.....	17
3.5 Exportation du fer par la ferroportine .....	18
3.6 Régulation de l'homéostasie cellulaire du fer par le système IRE/IRP .....	18
4. Homéostasie systémique du fer .....	21
4.1 Distribution corporelle du fer .....	21
4.2 Erythrophagocytose et recyclage du fer héminique par les macrophages.....	23
4.2.1 Mécanismes de l'érythrophagocytose et du recyclage du fer.....	23
4.3 Absorption intestinale du fer .....	25
4.3.1 Absorption du fer non héminique .....	26
4.4 Régulation systémique du fer .....	28
5. Hepcidine .....	31
5.1 Découverte de l'hepcidine comme étant un peptide antimicrobien .....	31
5.2 Structure de l'hepcidine .....	32
5.3 Sites d'expression de l'hepcidine .....	33
5.4 Rôle de l'hepcidine dans la régulation de l'homéostasie du fer.....	35

5.5 Mécanisme d'action de l'hepcidine.....	36
5.5.1 Axe fonctionnel hepcidine-ferroportine .....	36
5.5.2 Interaction moléculaire entre l'hepcidine et la ferroportine .....	37
5.6 Régulation de l'expression hépatique d'hepcidine.....	39
5.6.1 Régulation d'hepcidine par le signal des réserves en fer.....	39
5.6.2 Régulation d'hepcidine par le signal inflammatoire.....	41
5.6.3 Régulation d'hepcidine par l'anémie, l'érythropoïèse et l'hypoxie .....	42
5.7 Pathologies liées à l'hepcidine .....	44
5.7.1 Hémochromatose héréditaire .....	44
5.7.2 Anémie des maladies inflammatoires chroniques (ACD) .....	44
6. Interaction entre le système immunitaire et le fer.....	45
6.1 Homéostasie du fer et immunité adaptative .....	45
6.2 Homéostasie du fer et immunité innée .....	46
7. Les récepteurs Toll-like .....	49
7.1 Localisation, structure et ligands des TLRs .....	49
7.1.1 Localisation des TLRs .....	49
7.1.2 Structure des TLRs .....	51
7.1.3 Ligands des TLRs.....	53
7.2 Modulation de la réponse immunitaire par le TLRs .....	55
7.3 Voies de signalisation des TLRs .....	58
8. Rôle des TLRs dans l'expression d'hepcidine et le développement des maladies inflammatoires .....	61
II. OBJECTIFS ET BUTS SPÉCIFIQUES .....	63
III. MATÉRIELS ET MÉTHODES .....	67
IV. RÉSULTATS .....	74
V. DISCUSSION ET CONCLUSION .....	96
VI. PERSPECTIVES.....	103
VII REFERENCES.....	106

## Liste des figures

Figure 1. Structure des clusters fer soufre. ....	5
Figure 2. Détoxification de l'oxygène et réaction de Fenton. ....	10
Figure 3. Capture du fer via la voie dépendante de la transferrine. ....	14
Figure 4. Régulation du métabolisme cellulaire du fer par le système IRE/IRP. ....	20
Figure 5. Distribution corporelle du fer chez l'adulte. ....	22
Figure 6. Erythrophagocytose et de recyclage du fer héminique. ....	24
Figure 7. Absorption intestinale du fer alimentaire par les entérocytes. ....	27
Figure 8. Séquences de l'hepcidine chez les mammifères et les poissons. ....	34
Figure 9. Structure de l'hepcidine humaine. ....	34
Figure 10. Axe fonctionnel hepcidine-ferroportine dans le contrôle du fer. ....	38
Figure 11. Régulation de l'expression hépatique d'hepcidine. ....	43
Figure 12. Mécanismes de rétention du fer durant les infections. ....	48
Figure 13. Les récepteurs Toll-like et leurs ligands. ....	50
Figure 14. Structure des TLRs. ....	52
Figure 15. Modulation de la réponse immunitaire par les récepteurs Toll-Like. ....	57
Figure 16. Les voies de signalisation induites par les TLRs. ....	60
Figure 17. Expression de l'hepcidine dans les macrophages RAW 264.7. ....	76
Figure 18. Etude cinétique de l'expression de l'hepcidine dans les RAW 264.7. ....	77
Figure 19. Etude cinétique de l'expression de la ferroportine dans les RAW 264.7. ....	78
Figure 20. Marquage de surface du F4/80 et analyse par FACS. ....	79
Figure 21. Expression de l'hepcidine dans les MPMs des souris sauvages. ....	80
Figure 22. Expression de l'hepcidine dans les MPMs TLR2 <sup>-/-</sup> . ....	81
Figure 23. Expression de l'hepcidine dans les MPMs MyD88 <sup>-/-</sup> . ....	82
Figure 24. Expression de l'hepcidine hépatique in vivo. ....	84
Figure 25. Taux du fer sérique. ....	85
Figure 26. Saturation de la transferrine. ....	86
Figure 27. Taux sérique de TNF-alpha. ....	87
Figure 28. Taux sérique d'interleukine 6. ....	88
Figure 29. Etude cinétique de l'expression de l'hepcidine hépatique. ....	89
Figure 30. Etude cinétique de l'expression de la ferroportine hépatique par qRT-PCR. ....	90
Figure 31. Etude cinétique de l'expression protéique de FPN1 hépatique par WB. ....	91
Figure 32. Quantification de l'expression protéique de FPN1. ....	91
Figure 33. Taux du fer sérique. ....	92
Figure 34. Saturation de la transferrine. ....	93
Figure 35. Expression d'interleukine 6 dans les cellules RAW 264.7. ....	95

*À ma famille qui m'a soutenu tout au  
long de mes études*

## **Remerciements**

Nombreux sont ceux qui m'ont aidé, encouragé, réconforté, soulagé, tout au long de ma maîtrise et je ne saurais leur exprimer mes remerciements autant que je le souhaiterais; leurs discussions, leurs conseils, leur présence, me furent éminemment précieux. En écrivant leur nom sous la forme du cèdre de mon pays le Liban, je suis gré de la disponibilité, de la patience, et de la bienveillance de :

**D<sup>re</sup> Manuela Santos**

**D<sup>re</sup> Marika Sarfati**

**D<sup>r</sup> Janos G. Filep**

**D<sup>r</sup> Edward Bagu**

**D<sup>r</sup> Rafik Terra**

**Alexandre Reuben**

**Jean-Baptiste Loubert**

**Annie Calvé**

**Hua Huang**

**Xuehai Wang**

**Zenghui Wu**

# **I. INTRODUCTION**

## **INTRODUCTION**

Le fer est un oligoélément nécessaire pour le fonctionnement normal de toutes les cellules de l'organisme. Chez l'Homme, bien qu'il soit présent en très faible quantité, le fer joue un rôle essentiel dans de nombreuses fonctions biologiques. C'est un composant essentiel des protéines et d'enzymes impliquées dans des processus métaboliques tels que le transport de l'oxygène, la synthèse d'ADN et la production d'énergie. Le fer est également essentiel pour la régulation de la croissance et la différenciation cellulaires. Cependant, le taux du fer dans l'organisme doit être bien régulé, sinon la carence en fer entraîne divers états pathologiques comme l'anémie et la diminution de l'immunité. D'autre part, la surcharge en fer potentialise la disposition des microbes et aggrave les infections, ainsi que la formation des radicaux libres ayant des effets toxiques sur les cellules et leurs composants, favorisant ainsi des pathologies cardiovasculaires, inflammatoires et des cancéreuses.

## 1. Propriétés chimiques et fonctions biologiques du fer

Le fer est un composant de plusieurs métalloprotéines et joue un rôle crucial dans les activités biochimiques vitales, telles que la détection et le transport d'oxygène, le transfert d'électrons et la catalyse [1].

Dans tous les organismes, le fer est impliqué dans un large éventail de fonctions métaboliques, mais sa biodisponibilité est généralement limitée, car dans des conditions d'aérobie, le fer ferreux ( $\text{Fe}^{2+}$ ) est rapidement oxydé en fer ferrique ( $\text{Fe}^{3+}$ ) qui est pratiquement insoluble à pH physiologique [2].

Le fer a un potentiel redox en tant que métal de transition où il subit des réactions d'oxydation-réduction entre ses états ferreux et ferrique. Cette capacité de pouvoir accepter ou donner alternativement un électron fait du fer le cofacteur de choix de nombreuses réactions enzymatiques qui sont essentielles pour le métabolisme cellulaire et le fonctionnement de nombreuses enzymes cellulaires [1-2].

L'importance biologique du fer est largement attribuable à ses propriétés chimiques, par exemple sa capacité de former une variété de coordination complexe avec des ligands organiques, et cela dans un mode flexible et un environnement dynamique [2].

En général, trois types de réactions sont relatifs pour la plupart des fonctions biologiques du fer, chez tous les organismes: L'oxydoréduction, l'hydrolyse et la formation de complexes polynucléaires [1].



Les fonctions biologiques du fer sont la conséquence de sa liaison à de nombreuses protéines qui peuvent être classées en 3 catégories :

- **Les hémoprotéines**
- **Les protéines fer-soufre**
- **Autres protéines contenant du fer et protéines liant le fer**

### **1.1 Les hémoprotéines**

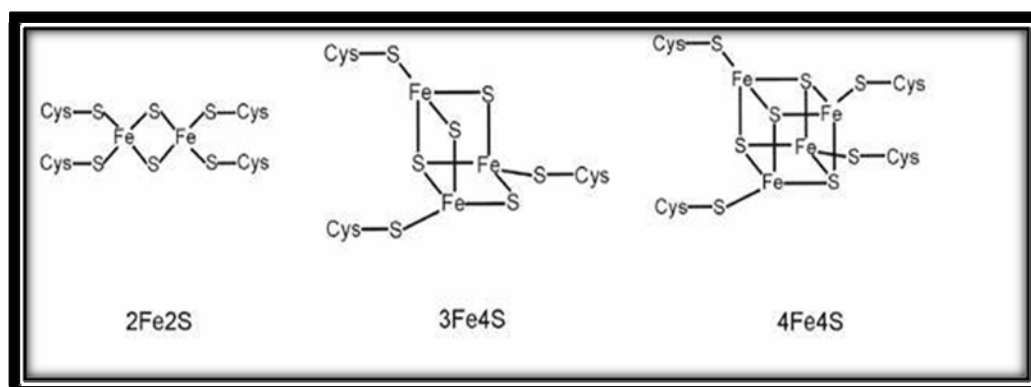
Une fraction importante du fer est associée à des protéines sous la forme d'un complexe appelé hème, un groupement fonctionnel des hémoprotéines qui sont présentes dans tous les tissus [3]. L'hème sert de prothèse pour des protéines impliquées dans le transport de l'oxygène, la respiration mitochondriale, le métabolisme des médicaments, la biosynthèse des stéroïdes, les défenses cellulaires antioxydantes et les processus de transduction du signal. Cette molécule est impliquée dans une variété d'événements biologiques en modulant la fonction ou bien l'état des hémoprotéines qui assurent différentes fonctions [4].

Parmi les hémoprotéines on distingue :

- a) L'hémoglobine et la myoglobine : Impliquées respectivement dans le transport d'oxygène par les érythrocytes et les muscles [2].
- b) Les cytochromes : Impliquées dans le transfert des électrons et dans le métabolisme énergétique mitochondrial. D'autres cytochromes, comme ceux du réticulum endoplasmique, sont impliqués notamment dans le métabolisme des acides gras [5].
- c) Les oxydases, catalases et peroxydases : Impliquées dans le processus de détoxification des espèces réactives de l'oxygène (ROS) [6].

## 1.2 Les protéines fer-soufre

Dans les protéines fer-soufre, les atomes du fer sont assemblés avec les atomes du soufre dans différents états d'oxydation, tels que le 2Fe-2S, le 3Fe-4S ou le 4Fe-4S formant une structure appelée cluster [7], (Figure 1). Ces clusters fer-soufre (Fe-S) sont présents dans plus de 200 différents types d'enzymes ou de protéines et constituent l'une des plus anciennes structures des molécules organiques. Ainsi, le processus de biosynthèse des clusters Fe-S est essentiel pour presque toutes les formes de vie et il est remarquablement conservé chez les organismes procaryotes et eucaryotes [8]. Ces clusters sont présents dans toutes les cellules vivantes où ils participent à divers processus physiologiques, y compris la respiration, la photosynthèse, la réparation d'ADN, le métabolisme et la réglementation de l'expression génique [9]. Les clusters Fe-S sont reconnus depuis longtemps comme cofacteurs essentiels et polyvalents des protéines, par exemple la rubrédoxine et la ferrédoxine qui interviennent dans la catalyse et le transfert des électrons dans une gamme de réactions métaboliques [10].



**Figure 1. Structure des clusters fer soufre.**

Les atomes du fer sont assemblés avec les atomes du soufre dans différents états d'oxydation, tels que 2Fe-2S, 3Fe-4S et 4Fe-4S formant une structure appelée cluster. Adapté de [10].

### 1.3 Autres protéines contenant du fer

D'autres protéines peuvent se lier directement à l'atome du fer, telles que les lipoxigénases, la lactoferrine et les ribonucléotides réductases :

#### a) Les lipoxigénases :

Les lipoxigénases (LOXs) sont une famille du fer non hémique contenant des dioxygénases qui catalysent l'oxydation des acides gras polyinsaturés [11]. La formation d'hydroperoxydes d'acides gras peut se produire soit par oxydation chimique ou bien par l'action d'enzymes, telles que les lipoxigénases [12]. Ainsi, ces acides gras peuvent être ensuite métabolisés en aldéhydes volatiles et en acide jasmonique chez les végétaux [13], des lactones chez les champignons [14], et en lipoxines et leucotriènes chez les mammifères [15]. Dans les plantes et les mammifères, la synthèse des LOXs se fait d'une façon ubiquitaire et récemment, elles ont été détectées dans les champignons et un certain nombre de bactéries [16]. Ces molécules jouent un rôle important dans la cicatrisation des plaies et les processus de défense chez les végétaux, tandis que chez les mammifères ils sont impliqués dans l'inflammation, l'asthme et les cardiopathies. Chez les champignons, ils jouent un rôle dans la régulation de la production des mycotoxines et du cycle de vie sexuée et asexuée [14]. À noter que jusqu'à présent, rien n'est connu sur la fonction biologique de ces enzymes chez les procaryotes.

#### b) La lactoferrine :

La lactoferrine (Lf) est une glycoprotéine de la famille des transferrines. Elle est exprimée et sécrétée par les cellules glandulaires et se trouve dans les granules secondaires des neutrophiles à partir de laquelle elle est libérée dans les tissus infectés et dans le sang au cours du processus inflammatoire. La Lf est connue pour être une protéine multifonctionnelle ou multi-tâches. C'est une composante importante du système immunitaire inné des mammifères.

Ses effets vont de la protection anti-microbienne directe des activités contre un large panoplie de micro-organismes comme les bactéries, virus, champignons et des parasites, à des activités anticancéreuses et anti-inflammatoires. Alors que la chélation du fer est au centre de certaines des fonctions biologiques, d'autres activités impliquent des interactions de la Lf avec des composants moléculaires et cellulaires de l'hôte et des agents pathogènes. Sa puissante activité antimicrobienne, les propriétés immunomodulatrices, ainsi que ses fonctions anti-cancérigènes et son importance croissante dans la prestation du fer et la croissance osseuse, font de cette molécule et ses dérivés des outils importants pour la santé [17].

c) Les ribonucléotides réductases :

Les ribonucléotides réductases (RNRs), également connues sous le nom de ribonucléosides diphosphates réductases, sont les seuls enzymes responsables de la conversion des nucléotides en déoxynucléotides dans toutes les cellules en division, et cela pour la synthèse de l'ADN [18]. La réaction catalysée par les RNRs est strictement conservée dans tous les organismes vivants. En outre, RNR joue un rôle critique dans la régulation du taux total de la synthèse d'ADN, de sorte que la quantité de l'ADN cellulaire est maintenue à un taux constant pendant sa réparation et durant la division cellulaire [19].

## 1.4 Protéines liant le fer

### a) La transferrine :

La transferrine (Tf) ou sidérophiline est une globuline monomérique synthétisée par le foie, constituée d'une seule chaîne polypeptidique porteuse de 2 sites de captation du fer, à raison de 2 atomes du fer par molécule de transferrine. Le rôle fondamental de la transferrine est de contrôler les niveaux du fer dans l'organisme en liant, séquestrant et transportant les ions  $\text{Fe}^{3+}$  ferrique, ce qui contribuera à maintenir la biodisponibilité du fer en empêchant en même temps le dépôt d'agréats insolubles d'hydroxyde ferrique [20]. Dans des conditions physiologiques normales, la capacité de Tf à lier le fer inorganique est très forte et sa saturation est à l'entour de 35%, ce qui suggère qu'il existe une capacité suffisante pour empêcher la libération du fer toxique dans la circulation qui endommage les cellules en catalysant la formation de radicaux libres [21]. En outre, la Tf est susceptible d'être impliquée dans le transport d'un large éventail d'ions de métaux autres que le fer. En plus, la Tf a une activité antimicrobienne qui repose apparemment sur le contact réel avec les bactéries plutôt que la privation du fer. Cependant, la Tf peut aider à la prolifération rapide des cellules tumorales, et cela par la translocation du fer aux sites tumoraux [20].

### b) La ferritine :

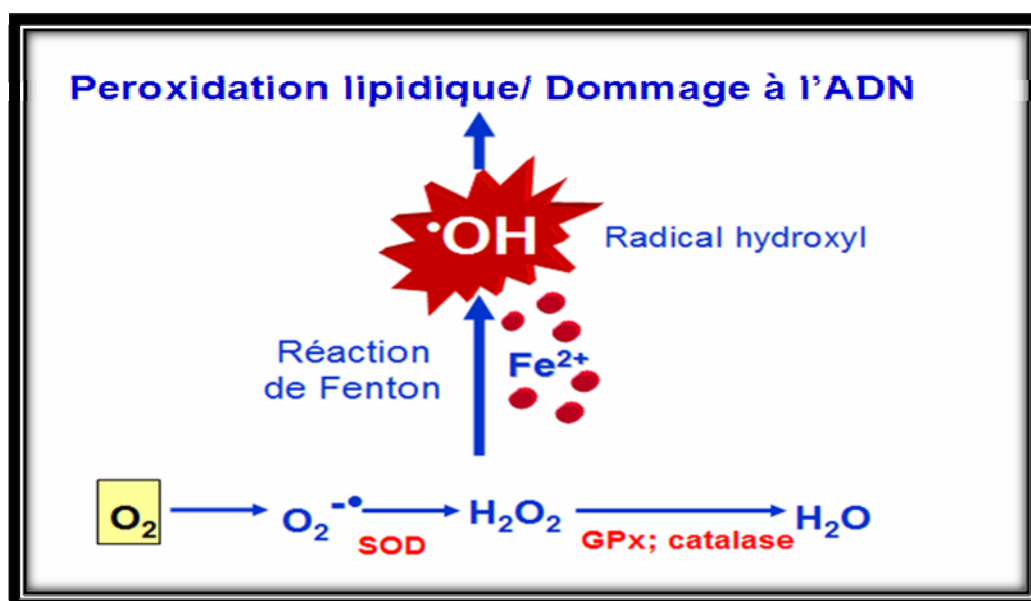
La ferritine, ou hémosidérine, est une protéine chargée du stockage du fer au sein des cellules à l'état soluble et non-toxique. D'autre part, la ferritine peut libérer une grande quantité du fer quand le corps est en carence. C'est une protéine cytoplasmique composé de 25 sous-unités hétérodimériques de chaînes légères (L-ferritin) et lourdes (H-ferritin) pouvant stocker jusqu'à 4500 ions  $\text{Fe}^{3+}$  [22]. Enfin, la ferritine est présente dans le foie, le cœur, la rate et la moelle osseuse et une quantité infime se trouve dans le sang sous forme de ferritine sérique [21].

## 2. Toxicité du fer

L'efficacité du Fer ferreux en tant que donneur d'électrons et celle du Fer ferrique comme accepteur d'électrons, avec un potentiel d'oxydoréduction compatible avec les contraintes de l'environnement cellulaire, est une caractéristique fondamentale pour de nombreuses réactions biochimiques, ce qui rend le fer un minéral et un nutriment essentiel [2]. Cependant, comme le corps n'a pas de voie active pour l'excrétion du fer, une charge continue supérieure à 1-2 mg/jour se traduira par une surcharge en fer et provoquera des dommages aux organes comme le foie, le cœur, le pancréas, la thyroïde et le système nerveux central [21].

La principale cause de ces dommages d'organes est due à la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) qui est largement basée sur les réactions chimiques de Fenton et Haber-Weiss où des quantités catalytiques du fer sont suffisantes pour produire des radicaux hydroxyles ( $\text{OH}^\cdot$ ), de superoxyde ( $\text{O}_2^{\cdot -}$ ) et des peroxydes d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) [23]. Dans les conditions physiologiques normales, le fer extracellulaire est exclusivement lié à la transferrine qui maintient le fer soluble et non toxique incapable de s'engager dans les réactions de Fenton et Haber-Weiss. Tandis qu'une petite portion de l'oxygène utilisé par la mitochondrie est réduite pour former des superoxydes qui seront convertis en eau ( $\text{H}_2\text{O}$ ) par la superoxide dismutase (SOD), la catalase (CAT) et la glutathione peroxydase (GPx) (Figure 2). Les radicaux libres sont des espèces hautement réactives et peuvent favoriser l'oxydation des protéines, la peroxydation des lipides membranaires et la modification des acides nucléiques. Parmi les ROS, le radical hydroxyle est la fraction la plus toxique et s'adresse aux glucides, aux protéines et aux acides nucléiques. Il est connu que la réaction des radicaux hydroxyles avec la base de l'acide nucléique 8-hydroxyguanine (8-OHG) est fortement corrélée à la tératogénicité et la cancérogénicité par des stress oxydatifs. Un autre ROS puissant montrant une réactivité similaire à celle du radical hydroxyle c'est l'hydroxy-peroxyde des lipides (ROOH).

Dans la surcharge en fer, les produits lipidiques tels que le peroxidative malondialdéhyde et les 4-hydroxy-2-nonenal sont augmentés, cela va entraîner la formation d'alkyl oxyradical ( $\text{ROO}^\cdot$ ) et d'alcoxy radical ( $\text{RO}^\cdot$ ). Ces radicaux lipidiques possèdent une demi-vie plus longue que les radicaux hydroxyles et ont également une plus forte capacité pour la toxicité chronique des cellules et les dommages de l'ADN [21].



**Figure 2. Détoxification de l'oxygène et réaction de Fenton.**

L'oxygène utilisé par la mitochondrie est réduit pour former des superoxydes qui seront convertis en eau ( $\text{H}_2\text{O}$ ) par la superoxide dismutase (SOD), la catalase (CAT) et la glutathione peroxydase (GPx). Dans des conditions physiologiques, le fer est lié à la transferrine qui maintient le fer soluble et non toxique incapable de s'engager dans les réactions de Fenton. Tandis que dans le cas d'un excès en fer ferreux ( $\text{Fe}^{2+}$ ), ce dernier va s'engager dans la réaction de Fenton et entraîner la libération des radicaux hydroxyles.

### 3. Homéostasie cellulaire du fer

L'homéostasie du fer doit être assurée à la fois au niveau cellulaire et par l'organisme dans son ensemble. En ce qui concerne l'homéostasie cellulaire, cette dernière doit être strictement contrôlée au niveau de la **captation**, du **stockage** et de **l'exportation du fer**.

#### 3.1 Captation du fer

Comme le fer est un cofacteur essentiel pour un large éventail d'importants processus cellulaires, sa captation par divers types de cellules est nécessaire. On distingue trois mécanismes de séquestrations du fer par les cellules :

- Mécanismes dépendants de la Tf et utilisés par presque toutes les cellules.
- Mécanismes spécifiques observés dans les macrophages et les entérocytes.
- Mécanismes indépendants de la Tf.

#### 3.2 Capture cellulaire du fer par des mécanismes dépendants de la Transferrine

##### 3.2.1 Récepteur de la transferrine (TfR)

Le TfR1 joue un rôle majeur dans l'absorption du fer cellulaire en se liant et internalisant le fer lié à la Tf (holotransferrine). Il appartient au groupe des récepteurs des membranes plasmiques présentant un cycle endocytose-recyclage qui s'amorce avec la fixation de leur ligand. Le TfR1 est une glycoprotéine dimerique faite de deux chaînes identiques ayant une masse moléculaire de 84,91 Da [24, 25]. Ces deux chaînes sont en situation parallèle et solidarisées par deux ponts disulfures établis entre les deux résidus 89 et les deux résidus 98 [26].

Chacune des deux chaînes comporte 760 résidus d'acides aminés distribués en trois domaines fonctionnels [24, 25]:

- Un domaine cytosolique aminoterminal de 61 acides aminés, directement impliqué dans le déclenchement de l'internalisation du récepteur chargé de son ligand [27].



- Un domaine transmembranaire de 28 acides aminés assurant l'ancrage du récepteur dans la membrane plasmique [28, 29].
- Un domaine extracellulaire carboxyterminal comportant 671 acides aminés, qui fixe la Tf avec une affinité beaucoup plus grande lorsque celle-ci est chargée de ses deux atomes de fer [28][30].

La plupart des cellules des mammifères expriment à la surface de leurs membranes des récepteurs pour la transferrine. L'expression la plus large a lieu sur les cellules nécessitant un apport important et continu en fer comme les précurseurs médullaires de la lignée érythrocytaire. Il est noté que le nombre de récepteurs augmente au cours de la maturation cellulaire, ainsi que dans le foie et les cellules en division rapide normales et malignes [31].

Récemment, un homologue proche du récepteur de TfR1 a été cloné : c'est le récepteur de la transferrine 2 (TfR2). Ce dernier présente 45% d'homologie avec TfR1 dans le domaine extracellulaire, et il est capable de lier la Tf pour fournir le fer aux cellules, mais cela avec une affinité 25 fois plus faible, suggérant que la capture du fer n'est pas la principale fonction de ce récepteur. Toutefois, la distribution du TfR2 diffère de celle du TfR1, l'expression la plus large a lieu sur les hépatocytes en différenciation et beaucoup moins sur les érythroblastes [31]. D'autre part, TfR2 n'était pas en mesure de compenser la fonction du TfR1 dans les souris « knock-out » qui meurent dans l'utérus [32]. Ainsi que des mutations au niveau du gène de ce récepteur ont été identifiées chez des patients italiens qui ont développé une surcharge en fer hépatique, indiquant qu'en plus de sa capacité de transporter le fer dans les cellules, TfR2 est également important dans le maintien de l'homéostasie du fer [33].

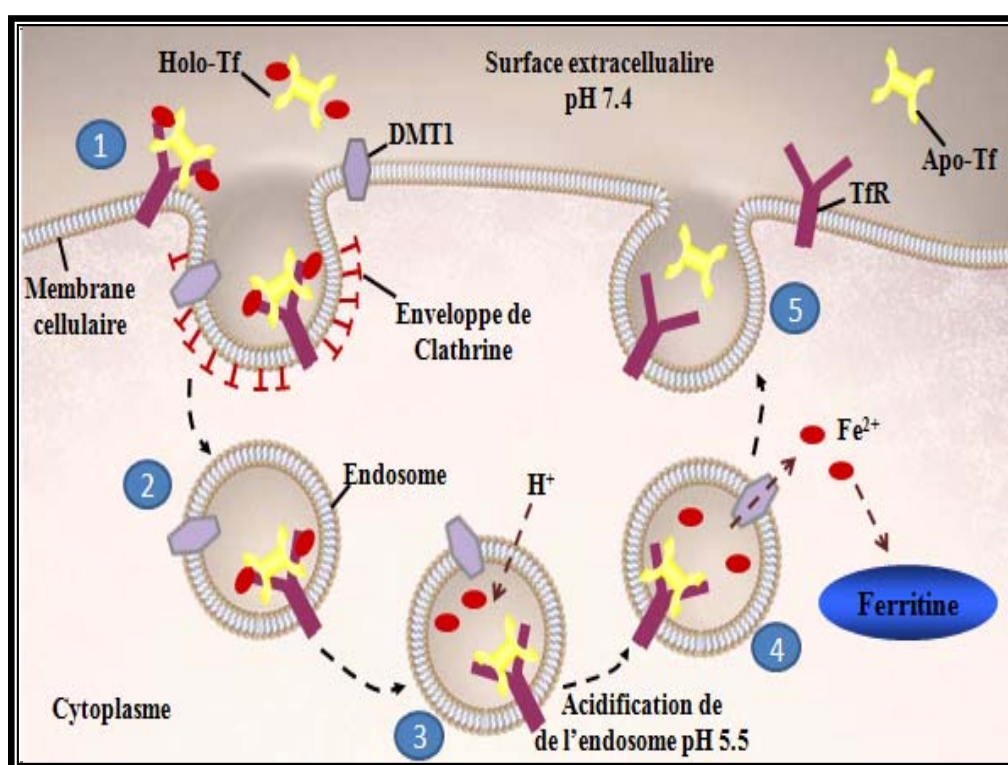
### 3.2.2 Cycle de la transferrine

En condition normale, le fer est majoritairement transféré vers le compartiment médullaire où il est nécessaire à la synthèse de l'hémoglobine. La fraction du fer non orientée vers ce compartiment est partagée entre les divers autres sites d'utilisation et les sites de stockage représentés surtout par les hépatocytes particulièrement sensibles aux surcharges en fer [34].

Le fer est principalement transporté dans le plasma sous forme de  $\text{Fe}^{3+}$  lié à la Tf. Le complexe Tf- $\text{Fe}^{3+}$ , nommé holotransferrine, est ensuite capté par TfR1 présent au niveau des différents organes. Le modèle d'internalisation du fer lié à la transferrine par le TfR1 recycle le complexe transferrine-récepteur et s'appelle le « transferrin-to-cell cycle » [35] (Figure 3).

Ce cycle débute par la liaison de la Tf ferrique au TfR1 à la surface cellulaire par une interaction physico-chimiques, ne nécessitant ni de température physiologiques ni d'énergie métabolique [23]. Le complexe Tf- $\text{Fe}^{3+}$ -TfR1, par un processus énergétiquement dépendants, est internalisé par endocytose suite à la formation de puits tapissés de clathrines qui s'invaginent pour former un endosome [36]. L'endosome formé subit une protonation ou bien une acidification progressive qui est ATPase-dépendante, ce qui entraîne la libération du  $\text{Fe}^{3+}$  de la Tf, et cela dans un pH acide d'environ 5,5. Malgré que le pH minimum dans les endosomes ne soit pas suffisant pour libérer le fer de ces deux sites de liaison dans la Tf, les cellules sont capables de le faire avec une capacité remarquable. En fait, des études ont montrés que le TfR1 joue un rôle non seulement par sa liaison à la Tf ferrique, mais aussi dans l'accélération de la dissociation du  $\text{Fe}^{3+}$  de la Tf dans de l'endosome [37, 38]. Ensuite, le  $\text{Fe}^{3+}$  est réduit en  $\text{Fe}^{2+}$  possiblement par la ferriréductase Steap3 « six-transmembrane epithelial antigen of the prostate 3 » et est transporté par le « divalent metal transporter 1 » (DMT1) à travers la membrane endosomale dans le cytoplasme [39, 40].

Au pH acide de l'endosome, l'apotransferrine (Tf sans fer) a une forte affinité pour le récepteur, pour cela elle demeure liée au TfR1 et le complexe est recyclé vers la surface cellulaire. À la surface cellulaire et dans un pH physiologique, l'affinité de l'apotransferrine pour le récepteur est perdue, ce qui entraîne sa séparation de TfR1 qui sera alors libre de lier d'autre Tf diférique [41]. Si le TfR1 n'est pas lié à la transferrine diférique, il n'est pas endocyté et passe dans la circulation sous forme de TfR1 soluble (sTfR1) grâce à des protéases membranaires [42].



**Figure 3. Capture du fer via la voie dépendante de la transferrine.**

Le complexe fer-transferrine (holotransferrine) est capté par le récepteur de la transferrine (TfR). Ensuite, il est inclus après invagination de la membrane dans une vésicule d'endocytose incluant le « divalent metal transporter 1 » (DMT1) qui assure la pénétration du fer dans le cytoplasme et ainsi la transferrine perd le fer pour devenir apotransferrine (Apo-Tf, Tf sans fer). Après passage du fer dans le cytosol, la vésicule d'endocytose s'ouvre en se fusionnant avec la membrane et le complexe Apo-Tf et TfR1 est recyclé vers la surface cellulaire libérant l'Apo-Tf transferrine dans la circulation générale. Adapté de [34].

### 3.3 Capture cellulaire du fer par des mécanismes indépendants de la Tf

Dans les conditions physiologiques, la Tf est la principale source du fer pour la plupart des cellules de l'organisme [43]. Cependant, dans divers états pathologiques de surcharge en fer, comme l'hémochromatose et la thalassémie, la quantité de cet ion dans la circulation dépasse la capacité de liaison à la transferrine, conduisant à l'apparition d'une forme du fer très réactif, c'est le fer non lié à la Tf (NTBI) « non-transferrin-bound iron » [44, 45].

Malgré les investigations, la détermination de la forme chimique de NTBI s'est avérée difficile à définir. Des études suggèrent qu'il est retrouvé sous la forme de complexe citrate-fer ou bien albumine-fer. Vraisemblablement, NTBI est présent principalement sous la forme  $\text{Fe}^{3+}$  [46]. Dans des circonstances normales, la Tf a une affinité exceptionnellement élevée pour le fer, ainsi la quantité de NTBI dans le plasma est extrêmement faible [47].

Auparavant, on croyait que la Tf était le seul moyen pour délivrer le fer aux cellules. Tandis que chez les humains ayant une maladie congénitale touchant la Tf, comme l'atransferrinémie (absence de la Tf) ou l'hypotransferrinémie (déficit en Tf), le fer est rapidement délivré aux tissus, et cela est accompagné par des états de surcharge en fer [48-50]. Mêmes observations ont été validées chez des souris dont le gène codant la Tf a été supprimé [51]. Ces observations appuient donc la présence des moyens de captation du fer cellulaire par des mécanismes indépendants de la Tf. Jusqu'à présent, il reste à clarifier comment NTBI fait son chemin à travers la membrane plasmique pour rentrer dans les cellules, mais plusieurs candidats ont été proposés :

a) Ferritine : En plus de la voie Tf-TfR, les hépatocytes et les cellules érythroïdes précurseurs peuvent également capturer le fer via la ferritine [52].

b) DMT1: En tant que transporteur membranaire majeur du fer, les souris dépourvues de DMT1 peuvent encore accumuler le fer au niveau du foie, suggérant que DMT1 n'est pas la seule voie d'entrée de NTBI [53].

c) Lipocaline 2 (LCN2): Connue sous le nom de lipocaline associée au gélatinase de neutrophile, c'est un petit peptide antimicrobien qui lie les sidérophores (de petites molécules synthétisées par les bactéries et les champignons) qui ont une haute affinité pour le fer. Lipocaline 2 transporte les complexes sidérophore-fer dans des cellules [54]. Malgré sa capacité de lier le fer libre dans la circulation, une étude récente faite dans notre laboratoire a montré que lipocaline 2 n'est pas essentielle dans le transport du fer dans le foie durant l'hémochromatose [55].

d) L-Type  $\text{Ca}^{2+}$ : Les canaux  $\text{Ca}^{2+}$  de type L est une voie importante car elle permet l'entrée de NTBI au niveau du cœur. Ainsi, dans des conditions de surcharge en fer, cette entrée mène à une accumulation du fer au niveau de cet organe et engendre éventuellement une cardiomyopathie [56].

e) SFT: Stimulateur de transport du Fe. Cette protéine a été isolée des cellules érythroïdes des leucémies, en tant que transporteur du fer. Il semble jouer un rôle dans les mécanismes d'absorptions dépendantes et indépendantes de la transferrine, mais son rôle reste mal caractérisé [57, 58].

f) Zip14: Le transporteur de Zinc Zip14 pourrait être impliqué dans la capture du NTBI. Il a été montré qu'il facilite l'absorption de NTBI dans les hépatocytes [59].

### 3.4 Devenir du fer cellulaire

Après avoir pénétré dans la cellule, le fer doit être correctement réparti entre trois pools différents représentés par le **pool de transit**, le **pool fonctionnel** et le **pool de stockage** [60].

#### a) Le pool de transit :

Encore appelé pool du fer de bas poids moléculaire ou bien pool du fer labile (LIP). À partir de ce dernier le fer est adressé soit vers le pool fonctionnel, soit vers le pool de stockage. Il s'agit du fer présent dans le cytosol lié à des espèces chimiques de bas poids moléculaire [61]. Les niveaux de LIP reflètent le statut cellulaire et ainsi, des augmentations ou des baisses dans le LIP, activent des réponses liées à une déficience ou à une surcharge en fer [6].

#### b) Le pool fonctionnel :

Le pool fonctionnel est constitué par la quantité du fer nécessaire et suffisante pour assurer la survie et les fonctions respiratoires de la cellule, ainsi que les communications intercellulaires. Il s'agit du fer incorporé dans les protéines héminiques dont l'hémoglobine et les cytochromes et aussi du fer cofacteur de multiples protéines contrôlant le cycle cellulaire, comme : p53 « Tumor protein 53 », GADD45 « Growth Arrest and DNA-Damage Inducible 45 Gene », WAF1/p21 « cyclin-dependent kinase inhibitor » [62].

#### c) Le pool de stockage :

Le pool de stockage est dans sa grande majorité représenté par le fer lié à la ferritine. À tout moment, ce fer pourra être libéré pour gagner les sites d'utilisation et cela en fonction des besoins.

### **3.5 Exportation du fer par la ferroportine**

La ferroportine (FPN1) est connue comme étant l'exporteur unique du fer cellulaire chez les vertébrés [63-65]. La ferroportine se trouve dans tous les tissus impliqués dans le métabolisme du fer, tels que les entérocytes duodénaux, les macrophages et les hépatocytes.

Des études chez des souris « knock-out » ont montré que la perte totale de l'expression du ferroportine est létale au stade embryonnaire, en raison de l'incapacité de transférer le fer de la mère à l'embryon [66]. En effet, chez des souris « knock-out », où l'expression de la ferroportine est préservée durant l'interface materno-fœtale, les nouveaux nés présentaient une carence sévère en fer, causée par une déficience dans l'absorption intestinale du fer alimentaire, une diminution de la libération du fer hépatique, ainsi qu'une réduction de la libération du fer par les macrophages [66]. Ces études suggèrent que chez les mammifères, la ferroportine est le seul exporteur significatif du fer dans les tissus impliqués dans l'absorption, le recyclage et le stockage du fer.

Parmi les nombreux mécanismes qui concourent au maintien de l'homéostasie cellulaire du fer, un mécanisme post-transcriptionnel des gènes liés au métabolisme du fer semble particulièrement important : le système IRE/IRP.

### **3.6 Régulation de l'homéostasie cellulaire du fer par le système IRE/IRP**

L'homéostasie cellulaire du fer est assurée par un contrôle de l'expression du récepteur de la transferrine et de la ferritine, qui régulent respectivement l'absorption et le stockage du fer. La synthèse du TfR1 et de la ferritine est réciproquement contrôlée au niveau post-transcriptionnel, et cela en réponse à la concentration du fer intracellulaire [67].

Les ARNm codant le TfR1 et la ferritine contiennent au niveau de leurs régions 5' ou 3' non traduites (UTR) « untranslated regions », des motifs structuraux appelés éléments de réponse au fer (IREs) « iron responsive elements » [68].

Les IREs sont des séquences nucléotidiques particulières avec des structures secondaires en épingle à cheveux [69]. Les ARNm de la ferritine possèdent une séquence IRE dans leur région 5'UTR, tandis que les ARNm codant le TfR1 possèdent cinq séquences IRE dans leur région 3'UTR [70, 71].

Les IREs sont la cible de deux protéines cytoplasmiques régulatrices du fer (IRP1 et IRP2) « iron regulatory proteins 1 and 2 », qui peuvent lier la séquence IRE avec une haute affinité. L'incidence de la liaison IRP-IRE est différente selon que la séquence IRE est localisée en 5' ou bien en 3' UTR. En effet, la liaison de l'IRP à l'IRE en région 5'UTR bloque la traduction de l'ARNm considéré, alors que sa liaison à l'IRE en région 3'UTR empêche la dégradation de cette ARNm et permet donc sa traduction [72].

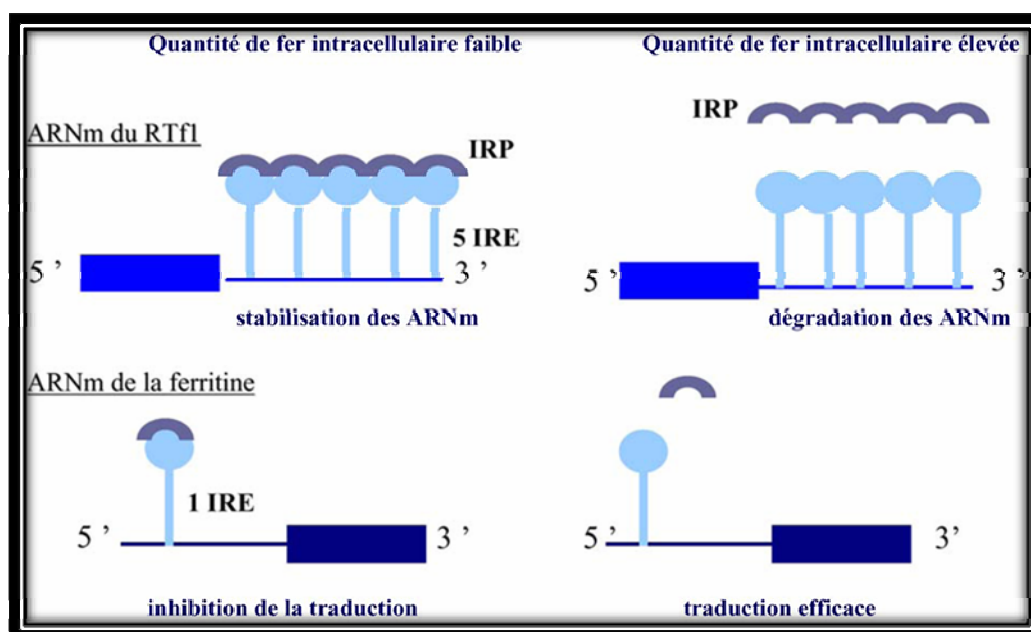
Dans le cas de carence en fer cellulaire, IRP1 et IRP2 vont se lier sur l'IRE en 5'UTR du mRNA de la ferritine et entraîner sa dégradation, empêchant ainsi le stockage du fer en excès, d'autre part IRP1 et IRP2 vont se lier sur l'IRE en 3'UTR de l'ARNm de la TfR et augmenter sa traduction, augmentant ainsi l'entrée du fer dans la cellule [73, 74].

Par contre, lorsque la concentration cellulaire en fer est élevée, les IRPs ne peuvent pas s'y associer aux IRE des ARNm [75] (Figure 4). L'IRP1 va s'associer avec un cluster 4Fe-4S, ce qui l'empêche de se lier à l'IREs des ARNm du TfR1 et de la ferritine, tandis que l'IRP2 est dégradée par ubiquitination [76].



Aussi, les ARNm de DMT1 et de la Tf possèdent respectivement une et cinq séquences IRE dans leur région 3'UTR, ainsi que la Fpn qui a un IRE dans son extrémité 5'UTR [77].

Cependant, le rôle des IREs dans le contrôle de l'expression de la Tf, du FPN1 et de DMT1 par les concentrations intracellulaires en fer n'est pas encore bien élucidé. Enfin, le système IRP/IRE peut être influencé par des signaux indépendants du fer, tels que les niveaux du peroxyde d'hydrogène et de l'oxyde nitrique, ainsi que par l'hypoxie [74].



**Figure 4. Régulation du métabolisme cellulaire du fer par le système IRE/IRP.** Lorsque la cellule est déficiente en fer, IRP1 et IRP2 vont se lier sur l'IRE en 5'UTR du mRNA de la ferritine et entraîner sa dégradation, empêchant ainsi le stockage du fer en excès, d'autre part IRP1 et IRP2 vont se lier sur l'IRE en 3'UTR de l'ARNm de la TfR et augmenter sa traduction, augmentant ainsi l'entrée du fer dans la cellule. Par contre, lorsque la concentration cellulaire en fer est élevée, les IRPs ne peuvent pas s'y associer aux IRE des ARNm, ce qui augmente l'expression de la ferritine et diminue celle du TfR. Adapté de [78].

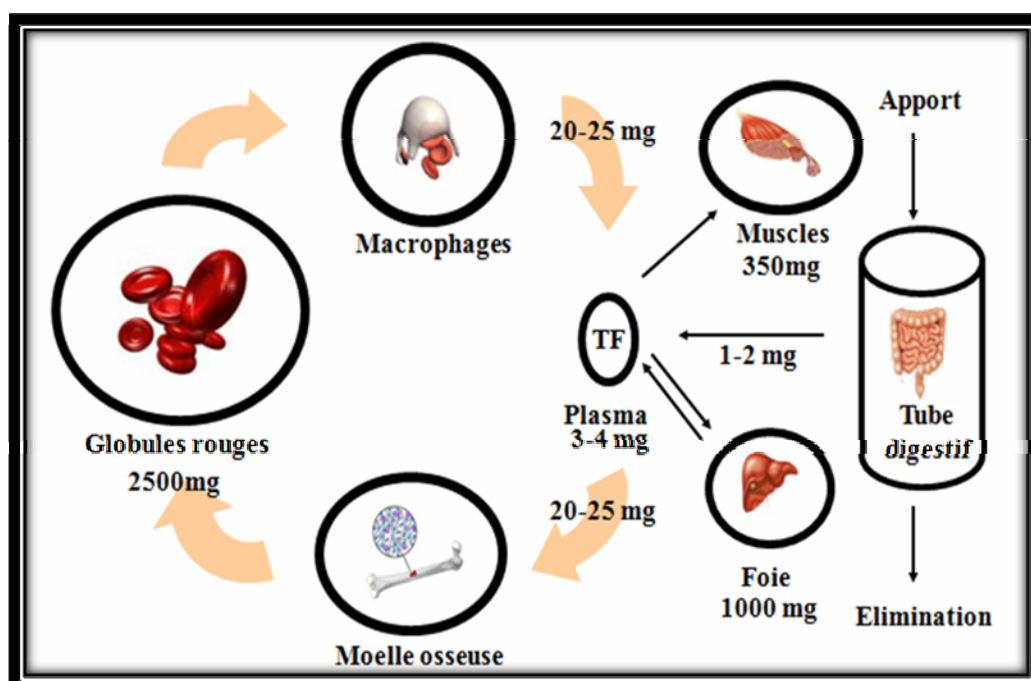
## 4. Homéostasie systémique du fer

Le fer est un véritable paradoxe étant d'une part indispensable à notre organisme et pouvant de l'autre lui être nocif. Comme les mammifères ne possèdent pas de voie physiologique efficace pour l'excrétion du fer, la régulation de cet ion métallique s'avère tout à fait nécessaire. L'homéostasie systémique de l'absorption et du recyclage du fer est réglementée notamment au niveau de son absorption d'une façon à empêcher aussi bien un trop peu qu'un trop du fer [34].

### 4.1 Distribution corporelle du fer

Afin de comprendre comment l'homéostasie systémique du fer est maintenue, il est prudent d'examiner le mouvement de cet ion entre les différents compartiments fonctionnels du corps. L'organisme d'un Homme adulte contient environ 4 g du fer total [79]. Dans des conditions normales, 1-2 mg du fer sont absorbés quotidiennement via les entérocytes des villosités du duodénum et de la partie proximale du jéjunum. Ce fer alimentaire absorbé est ensuite libéré dans la circulation où il va être lié à la Tf sérique. Environ 3 mg du fer-Tf sont présents dans la circulation sanguine. Bien que cela ne représente qu'une faible proportion du fer corporel total, ce compartiment est vital pour le maintien de l'homéostasie. En fait, ce fer est utilisé par la moelle osseuse à un rythme approximatif de 22 mg par jour pour la synthèse de l'hémoglobine des globules rouges durant l'érythropoïèse [79]. Dans le corps humain, 80% du fer est incorporé dans l'hémoglobine des globules rouges circulants [60]. Cependant, les globules rouges sénescents sont éliminés de la circulation par les macrophages de système réticulo-endothélial où le fer sera libéré de l'hémoglobine et sera ou bien stocké dans la protéine de stockage la ferritine, ou bien libéré dans la circulation pour lier la Tf. Les macrophages recyclent à l'entour de 22 mg du fer par jour, remplaçant ainsi le montant repris par la moelle osseuse (Figure 5).

Pour des quantités absolument infimes, d'autres cellules de l'organisme absorbent le fer en utilisant la voie du TfR1. Ce fer va être utilisé pour la synthèse de différentes protéines intracellulaires contenant du fer, telles que l'hème, les cytochromes et les clusters fer-soufre. Approximativement, 10 à 15% du fer est présent dans telles protéines, avec 80% dans les myoglobines des cellules musculaires et le 20% restant est stocké dans la ferritine, principalement dans les macrophages et les hépatocytes du foie [79].



**Figure 5. Distribution corporelle du fer chez l'adulte.**

Le fer absorbé au niveau de l'intestin se lie à transferrine (TF) pour être distribué vers son plus grand consommateur la moelle osseuse et les globules rouges circulantes. D'autre part, les macrophages tissulaires phagocytent les érythrocytes sénescents et recyclent le fer contenu dans l'hème. Enfin, le fer est stocké dans les hépatocytes et retourne vers la circulation en cas de besoin.

## 4.2 Erythrophagocytose et recyclage du fer héminique par les macrophages

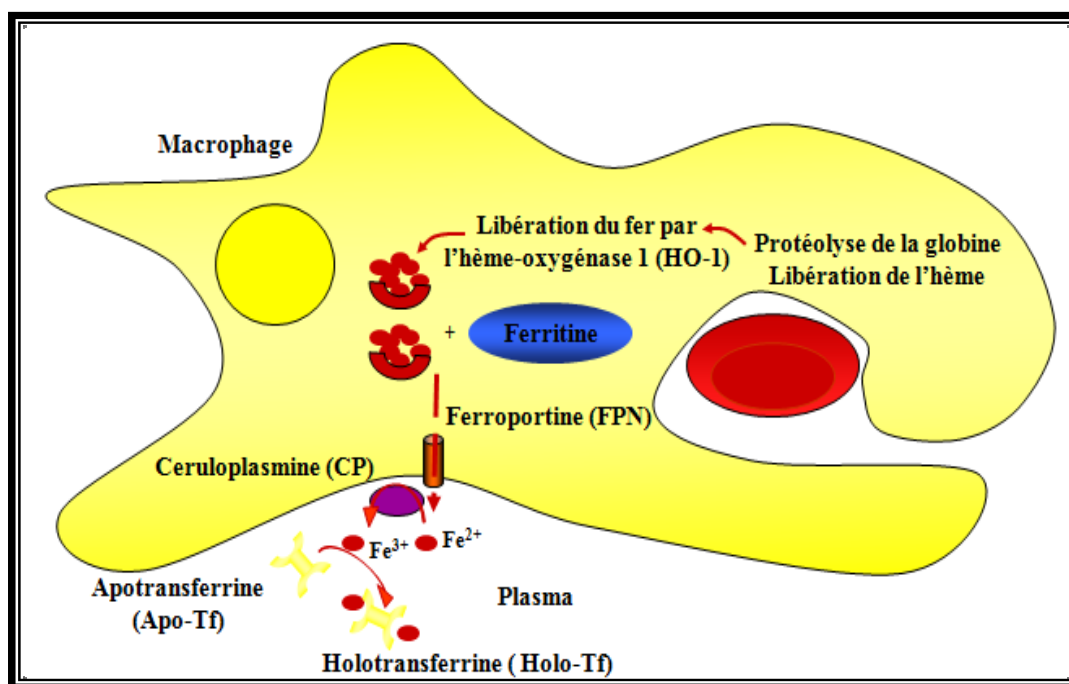
Les macrophages sont des phagocytes professionnels chargés de l'élimination de nombreux microorganismes, tels que les cellules apoptotiques, les pathogènes intracellulaires et les globules rouges sénescents. Ces différentes activités sont essentielles à l'immunité innée et adaptative, au remodelage tissulaire et au métabolisme du fer [80]. En effet, dans les maladies inflammatoires chroniques, l'anémie est fréquemment due à la rétention du fer dans les macrophages activés par les cytokines [81].

Chez l'Homme, plus de 60% du fer de l'organisme est incorporé dans l'hémoglobine des globules rouges dont la durée de vie est limitée à 120 jours. Ensuite, les érythrocytes sénescents circulants seront phagocytés par les macrophages de la rate, de la moelle osseuse et du foie. Ce processus permet de recycler 25 à 30 mg du fer par jour, correspondant aux besoins en fer nécessaires pour produire journallement environ 200 milliards de nouveaux érythrocytes. Ainsi, l'érythrophagocytose est une composante fondamentale de l'homéostasie du fer, et le recyclage du fer héminique représente la principale source du fer pour l'érythropoïèse [45].

### 4.2.1 Mécanismes de l'érythrophagocytose et du recyclage du fer (Figure 6)

L'accumulation progressive de modifications biochimiques membranaires par les globules rouges circulants conduit à la reconnaissance spécifique des globules rouges sénescents. Cette étape est suivie par l'internalisation du globule rouge par phagocytose. Ensuite, le phagosome continue sa maturation par une série d'événements de fusion membranaire avec différents compartiments vésiculaires, tels que les endosomes précoces, les endosomes tardifs et les lysosomes pour former un phagolysosome. Dans ce dernier, l'hème est dégradée par l'hème oxygénase 1 (HO-1), ainsi le  $\text{Fe}^{2+}$  est libéré et sort de l'endosome par DMT1 qui est un membre de la famille des protéines associées à la résistance naturelle du macrophage (NRAMP) « natural resistance-associated macrophage protein » [82].

Une fois libéré dans le cytosol, le fer héminique sera soit capté par la ferritine pour former le pool de réserve, soit recyclé vers le plasma à travers la FPN1, qui exporte le fer vers l'espace extracellulaire. Ensuite,  $\text{Fe}^{2+}$  sera oxydé en  $\text{Fe}^{3+}$  par la céruloplasmine (CP) et se fixera sur la transferrine plasmatique pour être distribué aux précurseurs érythroïdes de la moelle osseuse [83]. De même les macrophages sont capables de recycler et de stocker le fer à travers le récepteur CD163 « Cluster of differentiation 163 » qui entraînera l'endocytose du complexe hémoglobine (HB) et haptoglobine (HP), ce qui représente aussi une voie importante pour l'absorption du fer dans les macrophages [84]. Enfin, les macrophages sont aussi capables de capter le fer à travers un mécanisme dépendant du complexe  $\text{Tf-Fe}^{3+}$ -TfR1.



**Figure 6. Erythrophagocytose et de recyclage du fer héminique.** Les macrophages sont capables de recycler et de stocker le fer contenu dans l'hème des globules rouges sénescents. L'hème est dégradée par l'hème oxygénase 1 (HO-1), ainsi le  $\text{Fe}^{2+}$  est libéré et sort de l'endosome par DMT1. Dans le cytosol, le fer sera soit capté par la ferritine pour former le pool de réserve, soit recyclé vers le plasma à travers la ferroportine1 (FPN1). Par suite, le  $\text{Fe}^{2+}$  sera oxydé en  $\text{Fe}^{3+}$  par la céruloplasmine (CP) et se fixera sur la transferrine plasmatique pour être distribué aux précurseurs érythroïdes de la moelle osseuse.

### 4.3 Absorption intestinale du fer

L'absorption du fer alimentaire s'effectue au niveau des entérocytes des villosités du duodénum et de la partie proximale du jéjunum. Ces derniers sont issus de la maturation des cellules souches des cryptes. Dans les conditions normales, l'apport alimentaire en fer apporté par l'absorption intestinale est de 1 à 2 mg par jour [43]. Malgré que cette quantité absorbée soit faible, l'absorption intestinale du fer constitue une étape capitale qui doit être bien régulée.

Les cellules souches des cryptes expriment à leur surface le TfR, et sont donc capables de capturer le fer par un mécanisme dépendant de la Tf [85, 86].

Le fer provenant de la diète se trouve sous deux formes : le fer héminique contenu dans la viande et le fer non héminique présent dans les végétaux et les produits laitiers [87]. Dans les entérocytes matures, le passage du fer héminique ou non héminique, de la lumière intestinale au plasma comporte trois étapes (Figure 7):

- 1) Franchissement de la membrane apicale, de la lumière digestive vers l'entérocyte.
- 2) Transport à l'intérieur de l'entérocytes, de la membrane apicale vers la membrane basolatérale.
- 3) Passage de la membrane basolatérale, de l'entérocyte vers le plasma.

#### 4.3.1 Absorption du fer non héminique

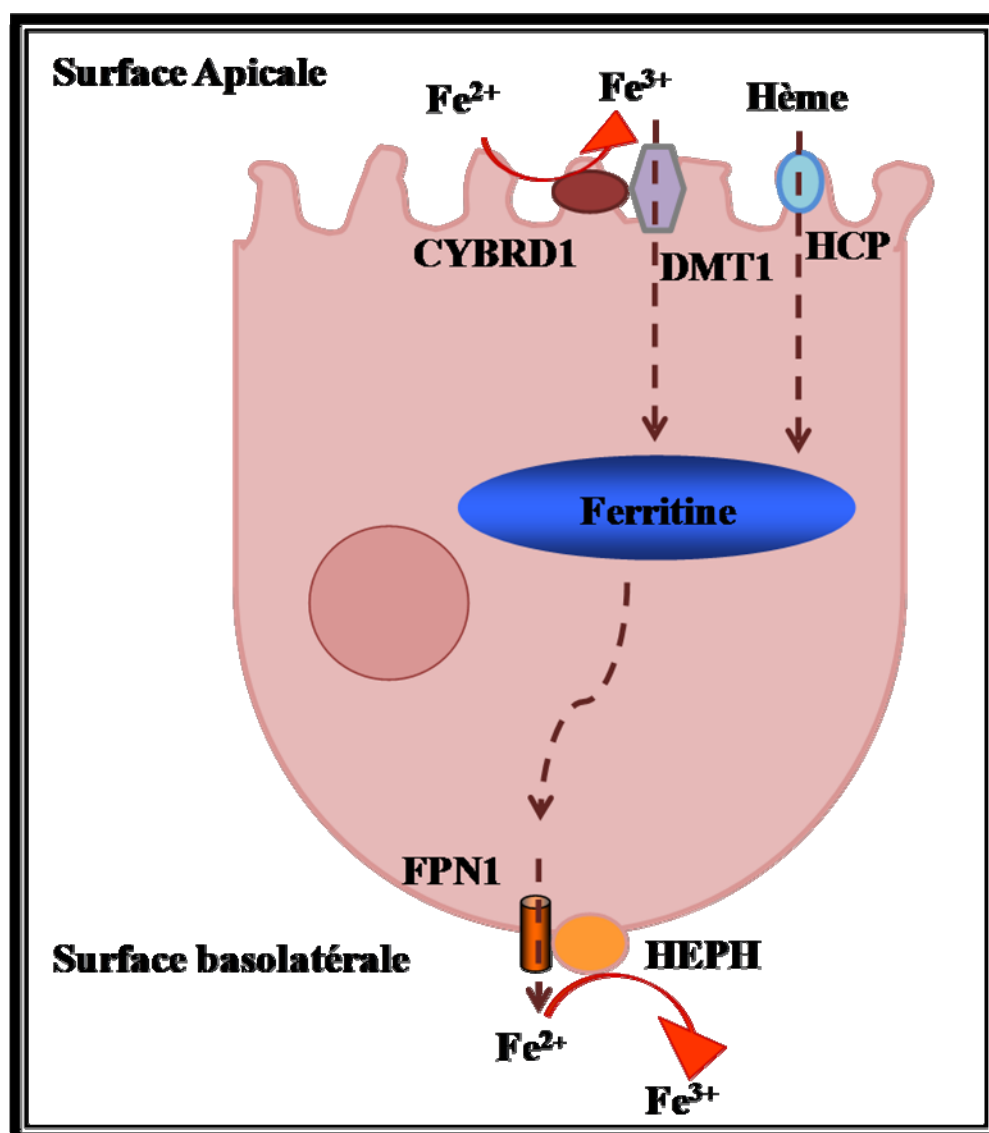
Les deux formes  $\text{Fe}^{2+}$  et  $\text{Fe}^{3+}$  sont présentes dans la lumière intestinale. Pour être absorbé, le  $\text{Fe}^{3+}$  contenu dans l'alimentation sera réduit en  $\text{Fe}^{2+}$  par une ferriréductase membranaire la cytochrome b réductase 1 (CYBRD1) présente d'une façon abondante au niveau de la membrane apicale des entérocytes [88]. Ensuite, le  $\text{Fe}^{2+}$  est transporté vers le cytoplasme par DMT1 qui est présent à des taux élevés dans les entérocytes de la bordure en brosse duodénale [89]. Ainsi, le  $\text{Fe}^{2+}$  rejoint le pool du transit à partir duquel il sera soit stocké dans la ferritine, soit exporté au pôle basolatérale de l'entérocyte pour rejoindre la circulation sanguine par l'action coordonnée de FPN1 et l'hephaestine (HEPHA), un homologue de la céruloplasmine [63, 64].

#### 4.3.2 Absorption du fer héminique

L'absorption du fer héminique s'effectue d'une façon presque similaire à celle du fer non héminique. En premier lieu, le fer héminique est transporté vers le cytoplasme par le transporteur apical HCP1 (Hème Carrier Protein 1) [90]. Ensuite, l'hème est dégradé par HO-1 et ainsi le  $\text{Fe}^{2+}$  est libéré et peut rejoindre le pool du fer non héminique internalisé par DMT1.

#### 4.3.3 Absorption du fer par la voie du complexe intégrine–mobilferrine

Un autre mécanisme permettant également l'absorption du fer non héminique, fait intervenir la voie du complexe intégrine–mobilferrine « integrin-mobilferrin pathway » (IMP). À la surface cellulaire des entérocytes, l'intégrine et la mobilferrine se lient uniquement au  $\text{Fe}^{3+}$  et le transportent vers le cytoplasme. Une fois dans le cytoplasme, le complexe protéique intégrine-mobilferrine se combine à la flavine monooxygénase et à la  $\beta 2$ -microglobuline pour former la paraferritine. Cette dernière est un complexe ayant une masse moléculaire de 520 kDa possédant une activité ferriréductase permettant la conversion du  $\text{Fe}^{3+}$  en  $\text{Fe}^{2+}$ . Cependant, ce modèle d'absorption est seulement observé dans les entérocytes et son mécanisme exact n'est pas encore complètement élucidé [91].



**Figure 7. Absorption intestinale du fer alimentaire par les entérocytes.**

Le fer héminique sera réduit en  $\text{Fe}^{2+}$  par la cytochrome b réductase 1 (CYBRD1), ensuite le  $\text{Fe}^{2+}$  est transporté vers le cytoplasme par DMT1, tandis que le fer héminique est transporté vers le cytoplasme par le transporteur apical HCP1 (Hème Carrier Protein), pour rejoindre ensuite le pool du fer non héminique. Ainsi, le  $\text{Fe}^{2+}$  rejoint le pool du transit à partir duquel il sera soit stocké dans la ferritine, soit exporté au pôle basolatérale de l'entérocyte pour rejoindre la circulation sanguine par l'action coordonnée de ferroportine (FPN1) et hephaestine (HEPH).



#### **4.4 Régulation systémique du fer**

L'Homme ne possède pas une régulation de voie physiologique pour l'excrétion du fer. Par conséquent, l'homéostasie du fer dans l'organisme est régulée au niveau de son absorption. C'est pour cela que la régulation inadaptée de l'absorption du fer conduit à une carence ou bien à une surcharge en cet ion métallique [34]. En fait, plusieurs facteurs contribuent au maintien de l'homéostasie du fer, notamment la diète alimentaire, le contenu total en fer de l'organisme, l'activité érythropoïétique, l'hypoxie et les infections.

##### **a) La diète alimentaire :**

L'absorption intestinale du fer est influencée par la quantité du fer récemment apportée par l'alimentation. Ainsi, une quantité excessive du fer dans l'alimentation pendant plusieurs jours peut induire une moindre absorption du fer par les entérocytes. Ce phénomène est aussi connu sous le nom de « bloc muqueux » [92].

##### **b) Le contenu en fer de l'organisme :**

L'absorption intestinale du fer varie d'une façon inversement proportionnelle au stock du fer dans l'organisme. Il est bien établi que dans des conditions déficientes en fer, l'absorption est significativement stimulée, tandis que lorsque les réserves en fer sont reconstituées, l'absorption revient au niveau basal. Ce type de régulation semble intervenir dans la programmation des cellules souches des cryptes qui agissent comme senseur du niveau de saturation de la Tf sérique. En fait, la quantité du fer absorbée à partir de l'alimentation est déterminée par les concentrations de DMT1 et de FPN1 au niveau des entérocytes matures et ces concentrations sont probablement programmées par l'action du système IRE/IRP en fonction de la quantité du fer au niveau des cellules cryptiques [41].

c) L'activité érythropoïétique :

La majorité du fer de l'organisme est utilisée par la moelle osseuse pour la synthèse de l'hémoglobine des globules rouges durant l'érythropoïèse. Pour cela, l'activité érythropoïétique a une fonction dominante dans le contrôle de l'homéostasie du fer. En d'autres termes, ce signal a une plus grande capacité d'augmenter l'absorption du fer par rapport au contenu total en fer de l'organisme [34, 93]. En outre, dans les troubles touchant l'érythropoïèse tels que la thalassémie, l'anémie sidéroblastique et l'atransferrinémie, ce signal augmente l'absorption du fer indépendamment des réserves corporelles, ce qui entraîne une accumulation pathologiques du fer [2].

d) L'hypoxie :

L'hypoxie aiguë entraîne une augmentation de l'absorption du fer, ainsi que la production de l'érythropoïétine (EPO) qui est une hormone qui stimule l'érythropoïèse. Cela va produire un effet semblable au signal de l'activité érythropoïétique. Cependant, il est incertain si cette voie de régulation est vraiment distincte de celle induite par les régulateurs de l'activité érythropoïétique [60].

e) Les infections :

Les infections sont des régulateurs puissants du métabolisme du fer. Durant les infections, l'organisme stimulera la séquestration du fer pour empêcher le développement des bactéries pathogènes. Pour cela, la libération du fer par le foie et les macrophages ainsi que l'absorption intestinale sont diminuées [94]. Les régulateurs inflammatoires sont dominants par rapport aux régulateurs érythropoïétiques. Par exemple, dans l'anémie des maladies des infections chroniques, les cytokines inflammatoires réduisent l'érythropoïèse due à la séquestration du fer. Par contre, cela activera le régulateur érythropoïétique qui va stimuler l'absorption du fer.

Enfin, dans cette situation contradictoire, le régulateur inflammatoire domine le régulateur érythropoïétique entraînant une diminution de l'absorption intestinale et une anémie inflammatoire chronique [95].

L'hierarchie entre les différents régulateurs de l'homéostasie de cet ion prédit l'existence d'un facteur permettant de coordonner correctement l'utilisation du fer de stockage, d'absorption et de recyclage [70]. Ainsi, la recherche des agents modulant l'homéostasie a fait une évolution considérable avec la découverte de l'hepcidine qui est considéré comme le régulateur central de la l'homéostasie du fer [96].

## 5. Hepcidine

L'hepcidine tient son nom de son site majeur de synthèse « hep » pour hépatique et « idine » de son activité bactéricide [97]. L'hepcidine est un peptide hormonal, appartenant à la famille des  $\beta$ -défensines, synthétisé dans le foie, distribué dans le plasma et excrété dans l'urine [98]. Cette hormone peptidique est en effet l'hormone du fer autant recherchée. Elle joue un rôle hyposidérémiant en réglant l'absorption intestinale du fer, le recyclage du fer par les macrophages et la mobilisation du fer hépatique [99]. Outre son rôle dans la régulation du métabolisme du fer, l'hepcidine joue un rôle important dans la défense innée de l'hôte contre les infections [100]. Cependant, des études récentes ont clairement montré que la déficience en hepcidine due à la dérégulation de sa synthèse semble être la cause ultime de la plupart des formes des maladies de surcharge en fer [101].

### 5.1 Découverte de l'hepcidine comme étant un peptide antimicrobien

L'hepcidine a été découverte dans l'urine humaine et était nommé hepcidine [100]. Indépendamment, un autre groupe de recherche a découvert le même peptide dans le plasma et l'a nommé LEAP-1 « liver-expressed antimicrobial peptide » [102].

Appartenant à la famille des  $\beta$ -défensines, l'hepcidine ressemble structurellement à la famille des défensines à cause des quatre ponts disulfures dans sa structure tertiaire. En plus, tel que la plupart des peptides antimicrobiens naturels, l'hepcidine présente deux propriétés fondamentales: la charge cationique et le caractère amphipathique (hydrophobe et hydrophile) qui facilitent sa capacité à perforer les membranes des pathogènes [103].

Comme certains peptides antimicrobiens, l'hepcidine présente une double fonction : En plus de son rôle hyposidérémiant dans le métabolisme du fer, l'hepcidine fait partie du système immunitaire inné et constitue ainsi la première ligne de défense contre les infections fongiques et bactériennes. Des études ont montré, que l'activité antimicrobienne et antifongique de l'hepcidine sont beaucoup plus efficaces dans l'urine que dans le sang. En fait, l'hepcidine est active contre les bactéries Gram<sup>+</sup> comme *Staphylococcus aureus*, les bactéries Gram<sup>-</sup> par exemple *Escherichia coli* et les levures tel que *Candida albicans* [104].

Ainsi, l'hepcidine agit de deux manières contre les bactéries et les levures :

- 1) En attaquant et perforant directement la membrane des pathogènes [98].
- 2) En limitant la quantité du fer libre, ce qui inhibe la prolifération des micro-organismes [98].

## 5.2 Structure de l'hepcidine

Un seul gène code pour l'hepcidine chez l'Homme, tandis qu'il y a deux gènes codant l'hepcidine chez la souris, (hepc1 et hepc2), qui présentent respectivement une homologie de 76 et 58% avec le gène hepcidine humain [105, 106].

Le gène hepcidine humain (*HAMP*) est situé sur le bras long du chromosome 19. Les 2.5 Kb du gène Hamp contiennent deux introns et trois exons qui se transcrivent en ARNm de 0.4 Kb [101]. Cette ARNm est traduit en préprohepcidine de 84 acides aminés ayant dans sa partie N-terminale un site de clivage par la furine. Le clivage enzymatique permet d'obtenir un peptide de 25 acides aminés côté C-terminal, appelé hepcidine-25, qui constitue la seule forme mature et active [107-109].

L'étude d'hepcidines synthétiques mutées a permis d'établir que les 5 acides aminés N-terminaux sont essentiels pour l'activité de l'hepcidine [110]. À noter qu'il existe d'autres formes d'hepcidine de 20 et 22 acides aminés retrouvées essentiellement au niveau urinaire, provenant probablement de la dégradation de l'hepcidine 25 [100].

L'étude par spectrométrie de masse montre que le peptide natif de 25 acides aminés est riche en feuillets  $\beta$  et contient 8 cystéines formant 4 ponts disulfures [100]. Au cours de l'évolution, ces cystéines ont été très conservées et sont retrouvées dans différentes espèces [104] (Figure 8).

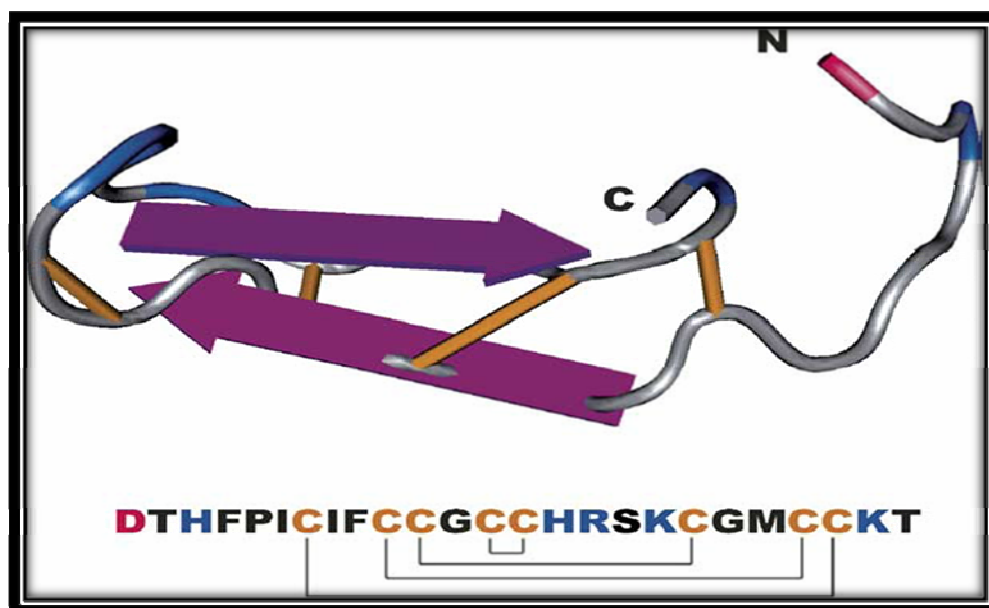
Par ailleurs, l'étude par résonance magnétique nucléaire, montre que l'hepcidine 25 se présente en forme d'épingle à cheveux dont les deux feuillets  $\beta$  anti-parallèles sont stabilisés par 4 ponts disulfures. L'un des ponts disulfures est formé par deux cystéines adjacentes situées dans le coude  $\beta$  de l'épingle, ce qui tend à renforcer extrêmement cette structure et à conférer une stabilité pour l'hepcidine en circulation [111] (Figure 9).

### 5.3 Sites d'expression de *HAMP*

*HAMP* est principalement exprimé au niveau du foie [102, 105], notamment dans les hépatocytes [112]. Également, l'expression de l'hepcidine est détectée dans d'autres sites, mais à plus faibles concentrations, comme la rate, le cœur, l'estomac, le cerveau, les poumons et le pancréas. La détection de l'hepcidine dans les reins a été rapportée, mais son rôle dans ce tissu reste inconnu [113]. Par ailleurs, l'hepcidine est exprimée dans les macrophages activés, tels que les macrophages spléniques [114], les macrophages dérivés des monocytes [115] et les macrophages pulmonaires [116]. Enfin, une étude récente montre que le tissu adipeux des patients obèses présente des taux élevés d'hepcidine par rapport au tissu adipeux d'individus non obèses, ce qui peut contribuer à l'hyposidérémie observée chez 70 % de ces patients [117].

<b>hHEP</b>	DTHFPICIFCCGCCHRSK-CGMCCKT
<b>pHEP</b>	DTHFPICIFCCGCCRKAI-CGMCCKT
<b>rHEP</b>	DTNFPICLFCCCKCKNSS-CGLCCIT
<b>mHEP</b>	DTNFPICIFCCCKCCNNSQ-CGICCKT
<b>bHEP</b>	GCRFCCNCCPNMSGCGVCCRF
<b>fHEP</b>	ISHISLCRWCCNCCKANKGCGFCCKT
<b>gHEP</b>	GIK---CKFCCGCCTPGV-CGVCCR

**Figure 8. Séquences de l'hepcidine chez les mammifères et les poissons.** Les espèces de mammifères sont : L'Homme (h), cochon (p), rat (r) et la souris (m). Les poissons sont : Bar (b), flet (f) et long-jawed mudsucker (g). Les cystéines conservées sont encadrées en rose. Adapté de [118].



**Figure 9. Structure de l'hepcidine humaine.**

L'hepcidine 25 se présente en forme d'épingle à cheveux dont les deux feuillets  $\beta$  anti-parallèles contiennent 8 cystéines et sont stabilisés par 4 ponts disulfures. L'un des ponts disulfures est formé par deux cystéines adjacentes situées dans le coude  $\beta$  de l'épingle. Les ponts disulfures et les cystéines sont représentés en jaune. Adapté de [78].

#### 5.4 Rôle de l'hepcidine dans la régulation de l'homéostasie du fer

Le premier lien entre l'hepcidine et l'homéostasie du fer a été établi en utilisant des modèles de souris présentant un déficit ou bien une production excessive d'hepcidine [102, 105]. La déficience en hepcidine a été identifiée par hasard en utilisant des souris ko pour un gène adjacent USF2 « upstream transcription factor 2 » [119]. Ces souris développaient une surcharge massive en fer avec un dépôt du fer dans le foie et le pancréas. Ces résultats étaient similaires à l'hémochromatose héréditaire de l'Homme, ce qui a suggéré que l'hepcidine est un régulateur négatif de l'absorption intestinale du fer et de la libération du fer des macrophages. En accord avec cette idée, des souris ayant une diète faible en fer présentaient une expression fortement réduite en hepcidine [120].

Une autre lignée des souris knock-out « USF2 » exprimant des niveaux normaux d'ARNm d'hepcidine n'a pas montré des altérations dans le métabolisme du fer, ce qui confirme que la surcharge en fer est due à une carence en hepcidine [120]. Cependant, des souris surexprimant l'hepcidine présentaient une carence en fer associée à une anémie ferriprive sévère. En outre, la plupart de ces souris sont mortes à la naissance, ce qui suggère que l'hepcidine inhibe aussi le transfert du fer placentaire [120]. Également, l'hepcidine semble réguler négativement l'exportation du fer par les hépatocytes, comme les souris surexprimant l'hepcidine, présentent une accumulation du fer hépatique [121].

Le rôle essentiel de l'hepcidine dans l'homéostasie du fer a été confirmé chez les humains. Les mutations du gène *HAMP* ont été trouvées dans plusieurs patients avec hémochromatose juvénile qui est la forme la plus sévère de l'hémochromatose héréditaire [122]. À l'inverse, les patients ayant des tumeurs du foie et surexprimant l'hepcidine souffraient d'une anémie sévère qui est seulement résolu après la résection tumorale ou bien la transplantation du foie [123].



De plus, l'injection des souris avec une dose unique d'hepcidine synthétique induit une hyposidérémie sévère qui dure environ 72 heures [124]. Enfin, toutes ces données impliquent que l'hepcidine joue un rôle hyposidérémiant en causant une déficience dans l'absorption intestinale du fer alimentaire, une diminution de la libération du fer hépatique, ainsi qu'une réduction de la libération du fer par les macrophages.

## **5.5 Mécanisme d'action de l'hepcidine**

### **5.5.1 Axe fonctionnel hepcidine-ferroportine**

L'hepcidine agit en se liant directement à la ferroportine, provoquant son internalisation et sa dégradation dans les lysosomes [125, 126]. Par conséquent, la dégradation de la ferroportine bloque l'exportation du fer cellulaire vers la circulation [126, 127].

En considérant la distribution tissulaire du ferroportine, l'interaction hepcidine-ferroportine joue un rôle important dans l'homéostasie du fer. Cette interaction contrôle l'absorption du fer dans le duodénum, ainsi que la libération du fer par les hépatocytes et les macrophages.

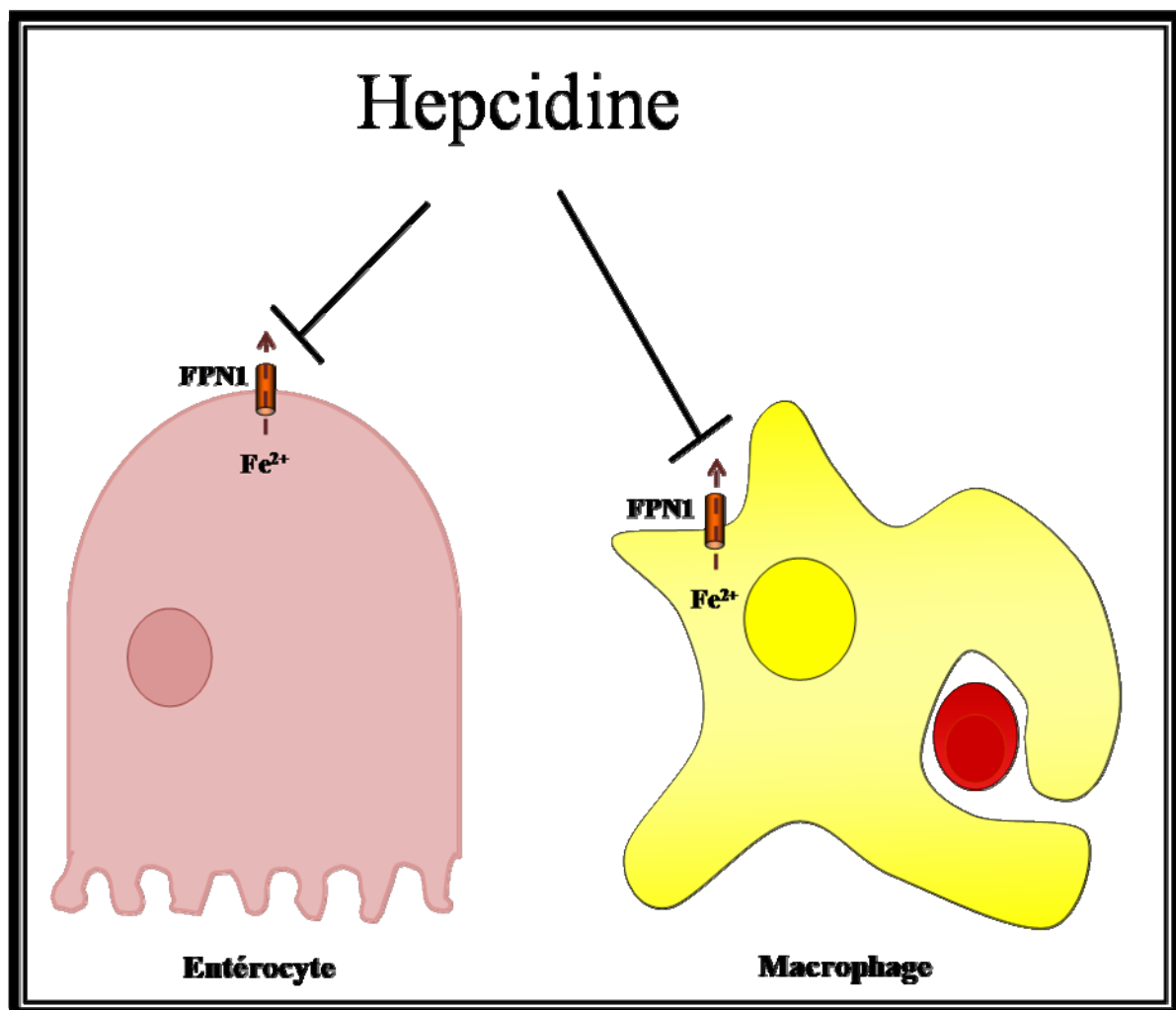
Lorsque les réserves en fer sont suffisantes, l'hepcidine sera produite notamment par le foie, et ciblera la ferroportine au niveau de la membrane basolatérale des entérocytes et du foie, bloquant ainsi le passage du fer hépatique et du fer alimentaire dans la circulation. Après 1 à 2 jours ces entérocytes dégénéreront et seront dégagés dans l'intestin, supprimant ainsi l'excès du fer de l'organisme. En plus, l'hepcidine induit la dégradation de la ferroportine dans les macrophages, entraînant la séquestration du fer (Figure 10). À noter que dans les états inflammatoires, le niveau de l'hepcidine est élevé et est donc responsable de la rétention du fer par les macrophages malgré la diminution du taux du fer sérique [103].

Lorsque les réserves en fer sont faibles, la production d'hepcidine est réduite et la ferroportine exprimée par les membranes basolatérale des entérocytes, les hépatocytes et les macrophages, transportera le fer dans la circulation où il se liera à la transferrine. En plus de la régulation du ferroportine par l'hepcidine, l'homéostasie du fer peut également réguler l'expression du ferroportine. En effet, le fer et l'inflammation sont capables de réprimer l'expression du ferroportine indépendamment de l'hepcidine [114, 128].

D'autre part, l'hepcidine peut avoir un effet indirect sur le système IRE/IRP en bloquant le flux du fer cellulaire, ce qui entraîne une augmentation du fer intracellulaire. Cela affectera l'expression du DMT1, du récepteur de la transferrine et du ferroportine qui contiennent des IREs. Cependant, l'interaction entre hepcidine-ferroportine et le système IRE/IRP n'est pas encore bien élucidé [103].

#### 5.5.2 Interaction moléculaire entre l'hepcidine et la ferroportine

Les signaux moléculaires impliqués dans l'internalisation de la ferroportine et sa dégradation ont été récemment identifiés. Les études montrent que l'hepcidine entraîne une phosphorylation d'une tyrosine située dans la région cytosolique du ferroportine [129]. Après cette phosphorylation, le complexe hepcidine-ferroportine est internalisé grâce à des puits recouverts de clathrines [130]. Une fois intériorisé, la tyrosine sera dephosphorilée et la ferroportine sera ubiquitinée et dégradée dans les lysosomes [126].



**Figure 10. Axe fonctionnel hepcidine-ferroportine dans le contrôle du fer.**  
L'hepcidine inhibe l'exportation du fer au niveau des intestinaux et les macrophages en affectant la stabilité de la ferroportine (FPN1).

## 5.6 Régulation de l'expression hépatique d'hepcidine

Étant le régulateur central du métabolisme du fer, l'expression de l'hepcidine doit pouvoir répondre à plusieurs facteurs physiologiques connus, tels que : le niveau des réserves hépatiques en fer, la demande en fer nécessaire à la fabrication des globules rouges par la moelle osseuse, ainsi que l'hypoxie et les situations inflammatoires (Figure 11) [97].

### 5.6.1 Régulation d'hepcidine par le signal des réserves en fer

Les mécanismes exacts par lesquels les réserves en fer influencent l'expression hépatique d'hepcidine ne sont pas encore bien connus. Il est considéré que la saturation de la transferrine sérique est le signal-clef qui reflète le taux des réserves hépatiques en fer [131]. Selon les études, la synthèse hépatique d'hepcidine semble être réglementée en réponse à la saturation du Tf et cela par une cascade de signaux déclenchés par la forme libre de la protéine HFE « Human hemochromatosis protein » [132]. Cette protéine est codée par le gène *HFE* dont les mutations sont aux maladies de surcharge en fer, notamment l'hémochromatose héréditaire (HH). Appartenant à la famille des protéines du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMHI), la molécule HFE est présente en surface de nombreux types cellulaires et en particulier au niveau des hépatocytes. La protéine HFE s'associe par un pont disulfure à la  $\beta$ 2-microglobuline, interaction indispensable à sa migration à la surface cellulaire où elle rentre en compétition avec l'holotransferrine pour le site de liaison au TfR1 [133]. Comparé à TfR1, TfR2 possède une affinité moindre pour l'holotransferrine [134, 135]. D'autre part, la liaison entre TfR2 et HFE constitue un senseur du fer de réserve, stimulant l'expression de l'hepcidine, via une voie de signalisation impliquant les MAP kinases « Mitogen-activated protein (MAP) kinases » [136].

Dans le cas d'une surcharge en fer, le niveau d'holotransferrine augmente et par conséquent TfR1 se trouve saturé et ne se lie pas à HFE. De ce fait, la forme libre de la protéine HFE se lie au TfR2, déclenchant une cascade de signalisations conduisant à la synthèse de l'hepcidine. Dans le cas d'une carence en fer, le niveau d'holotransferrine est diminué, par conséquent TfR1 n'est plus saturé et va se lier par défaut à la protéine HFE. De ce fait, la forme libre de la protéine HFE diminue de la surface cellulaire, ainsi que le TfR2 se trouvant également insaturé et aucun signal n'est transmis pour la synthèse de l'hepcidine. Enfin, la production d'hepcidine serait alors corrélée au nombre de molécules HFE libres à la surface cellulaire [137, 138].

En plus, il existe d'autres voies senseurs du fer de réserve qui régulent l'expression de l'hepcidine. L'hémojuvéline (HJV), qui est une protéine codée par le gène *HJV* dont les mutations sont liées à l'hémochromatose juvénile, joue un rôle majeur dans le contrôle de l'expression hépatique d'hepcidine [139]. Exprimée sur la membrane des hépatocytes, l'HJVm (Hémojuvéline membranaire), joue le rôle de corécepteur des BMPR (Bone Morphogenetic Protein Receptor) et participe à la transmission du signal né de l'interaction entre les BMPs et leurs récepteurs [140].

Des études ont montré, que la surcharge en fer stimule l'expression des gènes codant les BMPs. Ainsi, la signalisation par l'intermédiaire des récepteurs des BMPRs et du corécepteur HJVm active l'expression hépatique d'hepcidine via les facteurs SMAD, et les BMP-responsive elements (BMP-RE) localisés dans le promoteur du gène *HAMP* [140]. Par contre, dans le cas de carence en fer, l'HJVm sera clivée en une forme soluble (HJVs) capable de réprimer l'expression d'hepcidine [141].

Enfin, ces données permettent de proposer que la régulation de l'expression hépatique d'hepcidine par différents signaux des réserves en fer, est assurée par les protéines HFE, TfR2, BMPs et HJV.

### 5.6.2 Régulation d'hepcidine par le signal inflammatoire

En plus de son activité antimicrobienne, il est bien établi que l'hepcidine est une protéine de réponse précoce à l'inflammation [142]. Chez l'Homme, le lipopolysaccharide (LPS) augmente l'hepcidine urinaire. Également, chez les souris traitées avec du LPS, l'hepcidine hépatique ainsi que l'hepcidine macrophagique sont fortement induites. Par conséquent, il y aura une diminution de l'absorption intestinale du fer et une rétention du fer par les macrophages [143]. Cette réponse est considérée comme étant une réaction de défense de l'organisme qui vise à limiter la quantité du fer libre pour inhiber la prolifération des micro-organismes [144].

Le répertoire des cytokines inflammatoires capables de moduler l'expression de l'hepcidine a bien été déterminé. Alors que l'interleukine 6 (IL-6) et l'interleukine 1 beta (IL-1 $\beta$ ) induisent la transcription de l'hepcidine, le facteur nécrose tumorale  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) ne semble avoir aucun effet ou même il réprime l'hepcidine [143, 145, 146]. Durant l'inflammation, les macrophages constituent des relais cellulaires pour l'activation de la synthèse d'hepcidine hépatique. Une fois activés, les macrophages secréteront l'IL-6 qui stimule l'expression du gène *HAMP* dans les hépatocytes. Effectivement, l'IL-6 induit l'expression de l'hepcidine par l'intermédiaire de la voie JAK/STAT3, et le site de liaison STAT3 a été identifié dans le promoteur de l'hepcidine à proximité du promoteur BMP-RE [147]. Des études ont montré qu'il existe une certaine interférence entre les voies BMP/SMAD et JAK/STAT3 pour contrôler les niveaux d'hepcidine hépatique. En fait, la mutation touchant BMP-RE diminue l'effet d'IL-6, tandis que la réponse BMP est accrue lorsque le site de liaison STAT3 est supprimé [148].

### 5.6.3 Régulation d'hepcidine par l'anémie, l'érythropoïèse et l'hypoxie

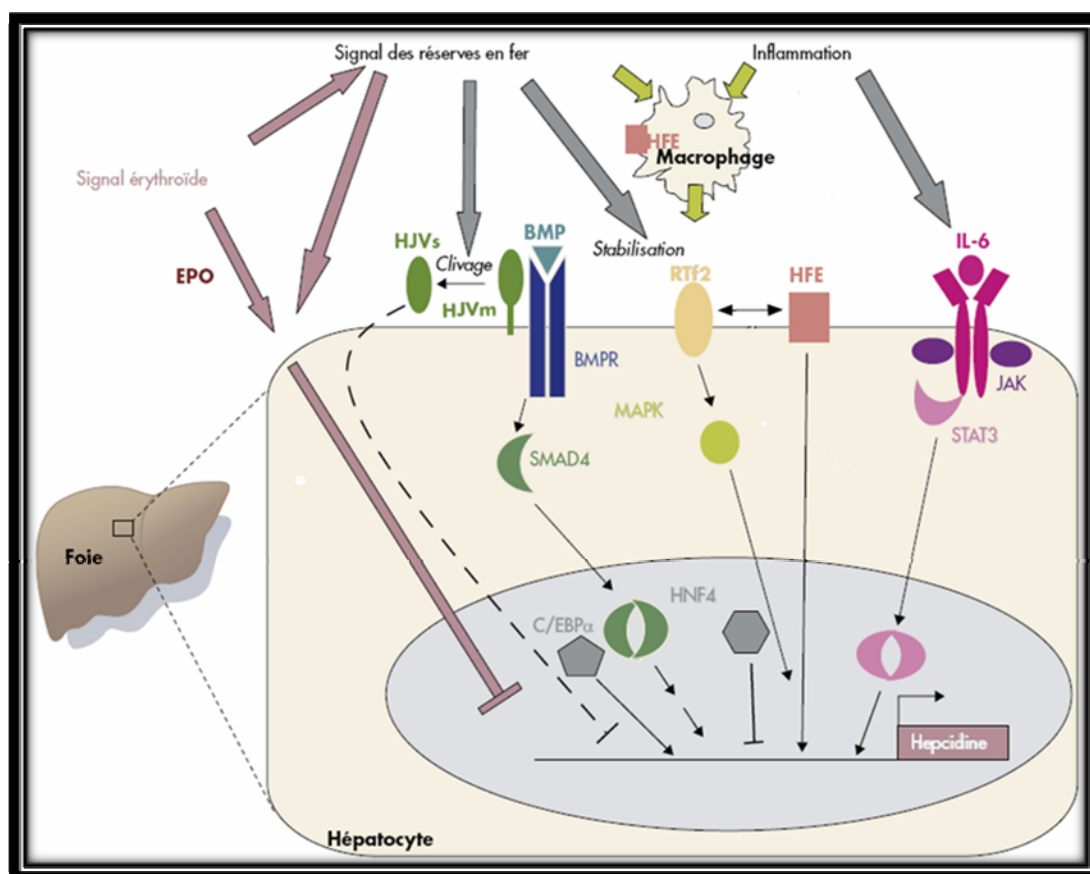
Outre les réserves en fer, l'anémie, l'hypoxie et l'érythropoïèse affectent également le métabolisme du fer. Dans l'anémie, la concentration de l'hémoglobine ainsi que le transport d'oxygène aux tissus est réduit, ce qui entraîne une hypoxie et stimule en même temps l'érythropoïèse [149]. Ces stimuli diminuent la synthèse d'hepcidine, pour éliminer l'effet inhibiteur sur l'absorption du fer et la libération du fer par les macrophages, afin qu'il y ait plus de fer disponible pour l'érythropoïèse [103].

Chez les souris, l'anémie induite par des mutations qui limitent l'absorption du fer dans l'intestin grêle montre une diminution des ARNm d'hepcidine hépatique. De même, l'anémie induite par saignement ou par hémolyse supprime également l'expression d'hepcidine hépatique [149]. D'autre part, l'expression de l'hepcidine est également diminuée chez les souris déficientes en transferrine, qui est nécessaire pour fournir le fer aux cellules notamment les cellules érythroïdes. Ainsi, ces souris sont anémiques et leur absorption intestinale du fer est maximale en réponse aux besoins de l'érythropoïèse. Par conséquent, le fer s'accumule dans le foie mais ne peut être utilisé par l'érythropoïèse en raison de l'absence de la transferrine. Donc, la faible expression de l'hepcidine chez ces souris suggère que les signaux provenant de l'érythropoïèse dominent le signal des réserves en fer hépatique assuré par la transferrine [96].

En fait, ces stimuli peuvent réprimer l'expression hépatique de l'hepcidine par l'intermédiaire de différentes molécules :

- GDF15 : Les études chez des patients thalassémiques, ont montré une concentration élevée de GDF15 « Growth differentiation factor 15 » sérique, qui est un membre de la famille TGF- $\beta$  « Transforming growth factor TGF $\beta$  » capable de réprimer directement l'expression d'hepcidine [150].

- EPO : L'hypoxie stimule la production d'érythropoïétine (EPO), une hormone qui agit comme facteur de croissance des précurseurs des érythroblastes dans la moelle osseuse. Les études ont montré que l'EPO peut bloquer directement l'expression du gène *HAMP*, ou bien indirectement en inhibant les voies SMAD et STAT3 [151, 152].
- Facteurs inductibles par l'hypoxie (FIH) : Le promoteur du gène *HAMP* possède des sites de fixation pour FIH qui se fixent au niveau du promoteur et empêchent la transcription de l'hepcidine [153].



**Figure 11. Régulation de l'expression hépatique d'hepcidine.**

L'expression de l'hepcidine répond à plusieurs facteurs physiologiques connus, comme : le niveau des réserves hépatiques en fer, la demande en fer nécessaire pour l'érythropoïèse, ainsi que l'hypoxie et les situations inflammatoires. Adapté de la revue d'Hématologie 2007 ; 13 (3) : 165-76.



## 5.7 Pathologies liées à l'hepcidine

### 5.7.1 Hémochromatose héréditaire

L'hémochromatose héréditaire (HH) est une maladie caractérisée par une accumulation progressive du fer, touchant divers organes. Cette maladie est liée à la mutation de divers gènes tels que *HFE*, *TfR2*, *HJV* et *HAMP* [154]. En regard de la surcharge du fer presque toutes les formes d'hémochromatoses ont en commun un taux d'hepcidine anormalement réduit. Ainsi, en absence d'hepcidine, l'augmentation de l'absorption intestinale du fer et de la sortie du fer des macrophages conduit à l'établissement d'une surcharge en fer [155]. Effectivement, l'accumulation du fer peut atteindre dix fois la quantité normale d'un individu sain. Ainsi, les patients développent une symptomatologie très variée, comprenant la cirrhose, l'hépatocarcinome, le diabète, la cardiomyopathie, l'arthrite et autres complications [97]. Jusqu'à présent, le seul traitement connu pour l'hémochromatose est la saignée [156].

### 5.7.2 Anémie des maladies inflammatoires chroniques (ACD)

L'induction de l'hepcidine dans les maladies inflammatoires, notamment les maladies rhumatismales, semble jouer un rôle majeur dans les anémies associées à l'inflammation [157]. En effet, durant l'inflammation, le taux d'hepcidine est considérablement augmenté, conduisant à une hyposidérémie [158]. Ainsi, lorsque l'inflammation persiste, l'expression du gène *HAMP* continuera d'être activée par les cytokines pro-inflammatoires, entraînant ainsi une anémie inflammatoire chronique (ACD). L'ACD est une anémie normochrome et normocytaire, caractérisée par une diminution du fer sérique et une augmentation de la ferritine, ainsi qu'une séquestration du fer dans les macrophages [143]. Tel que discuté dans une section précédente, l'hyposidérémie inflammatoire et le développement des anémies inflammatoires sont considérés comme étant des réactions de défenses de l'hôte pour priver les micro-organismes du fer.

## 6. Interaction entre le système immunitaire et le fer

Les cellules du système immunitaire sont capables d'exprimer des gènes et des protéines qui peuvent moduler l'homéostasie du fer, à la fois au niveau cellulaire et au niveau systémiques.

### 6.1 Homéostasie du fer et immunité adaptative

L'activation des lymphocytes B (LB) et T (LT) dépend de l'expression des TfRs à leur surface pour pouvoir utiliser le fer qui est nécessaire à la synthèse de l'ADN et à la division cellulaire [159]. En plus, la Lf est capable de stimuler la prolifération et la différenciation des LT en Th1 ou Th2 [160]. À la fois, les LT activés et non-activés synthétisent la ferritine, d'où leur rôle dans la mobilisation du fer et sa privation des microorganismes et des cellules tumorales [161].

Plusieurs études ont montré l'influence des protéines du système immunitaire adaptatif sur l'homéostasie du fer, notamment les molécules du CMHI. En effet une surcharge en fer est observée chez les souris « knock-out » pour le gène codant la  $\beta 2$  microglobuline ( $\beta 2m^{-/-}$ ) qui est nécessaire à l'expression du CMHI au niveau de la surface cellulaire. Ces souris présentent une grave diminution dans l'expression du CMHI et par conséquent ne possèdent pas des LT  $CD8^{+}$  [162, 163]. Avec la découverte du gène HFE et de la mutation C282Y qui empêche HFE de se lier à  $\beta 2m$ , il a été supposé que la surcharge en fer observée chez les souris  $\beta 2m^{-/-}$  est liée au mal fonctionnement de HFE [164]. Par contre, les souris double KO  $\beta 2mHFE^{-/-}$  ont révélé une surcharge en fer plus sévère que celle observée dans les souris  $\beta 2m^{-/-}$  et  $HFE^{-/-}$  toutes seules [165]. D'autre part, une étude sur des souris  $Rag1^{-/-}$ ,  $HFE^{-/-}$  et double KO  $Rag1HFE^{-/-}$ , a montré que les souris  $Rag1HFE^{-/-}$  présentaient une surcharge en fer plus grave que  $Rag1^{-/-}$  et  $HFE^{-/-}$  toutes seules. RAG1 étant nécessaire pour le développement des LT et LB, ces souris étaient dépourvues des LB et LT matures, ainsi que l'expression CMHI et de HFE [166]. Finalement, ces résultats permettent de prédire que le système immunitaire adaptative peut participer d'une certaine façon à la régulation de l'homéostasie du fer.

## 6.2 Homéostasie du fer et immunité innée

Étant un élément essentiel pour l'activité cellulaire, le fer semble être un défi pour la survie entre les hôtes de mammifères et leurs agents pathogènes. Ces derniers ont développé une multitude de stratégies biologiques pour acquérir, transporter et stocker le fer, telles que l'utilisation des récepteurs qui peuvent lier des molécules contenant le fer comme la Tf, la Lf et l'hémoglobine, ainsi que la production des molécules sidérophores qui acquièrent le fer à partir des protéines de l'hôte. De l'autre côté, l'hôte a aussi développé une variété de mécanismes pour retenir le fer afin de limiter le développement des micro-organismes [167] (Figure12). En fait, la régulation de l'homéostasie du fer durant les infections est considérée comme étant un mécanisme de défense pour empêcher la croissance des pathogènes microbiens. Chez l'hôte, plusieurs protéines impliquées dans le métabolisme du fer sont régulées pendant le processus inflammatoire causé par les infections, notamment NRAMP1, NRAMP2, Lf, LCN2, Tf, HAMP et FPN1 [168].

NRAMP1 est une protéine du métabolisme du fer qui joue un rôle important dans la lutte contre les infections. Cette dernière est exprimée dans les phagocytes et est recrutée dans les lysosomes de la membrane du phagosome où elle fonctionne comme un agent antimicrobien en favorisant la sortie du fer du phagosome, ce qui limitera la prolifération intracellulaire des microorganismes [169]. Chez l'Homme, des mutations dans le gène *NRAMP1*, ont été associées avec une forte susceptibilité à la tuberculose [170].

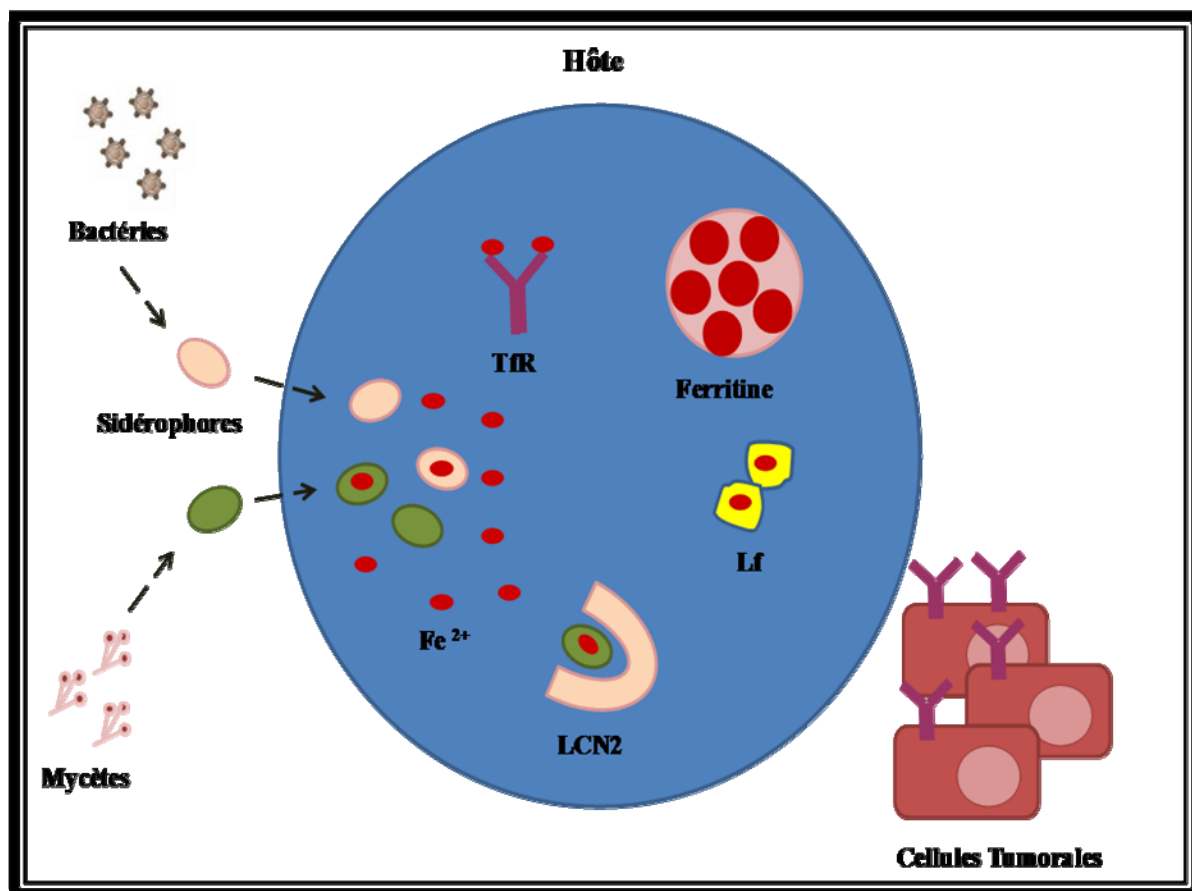
Également, DMT1 ou NRAMP2 est induite lors des infections causées par des pathogènes intracellulaires [171].

En plus, les neutrophiles vont sécréter un autre chélateur du fer, la LF qui va rentrer dans les phagocytes pour réduire le taux du fer disponible dans le phagosome [160]. D'autre part, lors des infections les TLRs stimulent la production de LCN2 par les cellules immunitaires, ce qui séquestre le fer lié aux sidérophores bactériens et limiter ainsi la croissance bactérienne [172].

Des études ont montré que durant leur maturation, les cellules dendritiques (CD) augmentent sensiblement l'expression de TfR1 et diminuent l'expression de FPN1 ce qui contribue aussi à la séquestration du fer [173]. Par contre, dans des conditions pauvres en fer, les CD sont incapables de se différencier et d'activer les LT [174].

HAMP, le régulateur majeur de l'homéostasie du fer, joue un rôle majeur dans cette modulation. En effet, durant les infections l'activation des macrophages à travers les récepteurs, Toll-like (TLRs) stimulera la transcription du facteur NF- $\kappa$ B qui sera responsable de la transcription des gènes codant une cascade de cytokines inflammatoires, telles que IL-1 et IL-6 qui stimuleront l'expression de l'hépcidine hépatique [139, 175]. Ce dernier, en plus de son activité antimicrobienne, entraînera l'internalisation et la dégradation de la FPN1, causant ainsi la séquestration du fer intracellulaire et une diminution des taux de fer sérique [126]. Cette réduction du fer extracellulaire est estimée à limiter la disponibilité du métal aux micro-organismes envahisseurs, contribuant ainsi à la défense immunitaire de l'organisme. En plus, l'hépcidine est exprimée de façon endogène par les cellules immunitaires, telles que les macrophages et les neutrophiles, capables de migrer dans le sang vers le site d'infection, constituant une nouvelle composante de la réponse immunitaire aux pathogènes [115]. Par contre, si l'inflammation persiste, ce mécanisme contribuera au développement des ACD.

Par ailleurs, des études récentes ont montré que l'induction de l'hépcidine hépatique par le LPS dépend de la voie de signalisation médiée par le récepteur Toll-like 4 (TLR4) [176]. Les TLRs appartiennent à la famille des PRRs (Pattern-Recognition Receptors), composants essentiels du système immunitaire, qui jouent un rôle essentiel dans le déclenchement des réponses immunitaires, en particulier dans l'immunité anti-infectieuse [177].



**Figure 12. Mécanismes de rétention du fer durant les infections.**

Durant les infections et les maladies inflammatoires, plusieurs protéines de l'hôte interviennent pour la rétention du fer loin des microorganismes et des cellules tumorales, notamment la ferritine, la lactoferrine (Lf), la lipocaline 2 (LCN2) et la transferrine (Tf). D'autre part, les agents pathogènes séquestrent le fer grâce à leurs sidérophores et aux récepteurs de la transferrine (TfR). De même les cellules tumorales séquestrent le fer grâce aux TfRs exprimés à leur surface.

## 7. Les récepteurs Toll-like

Le système immunitaire inné est la première ligne de défense contre l'invasion des micro-organismes. Les microbes sont complexes et présentent une grande variété de structures qui seront détectées par le système immunitaire. En utilisant les TLRs, les cellules comme les macrophages, les éosinophiles, les cellules dendritiques et les neutrophiles, jouent un rôle crucial dans la défense de l'hôte, en reconnaissant des motifs moléculaires associés à des pathogènes, nommés (PAMPs) « Pathogen Associated Molecular Patterns ».

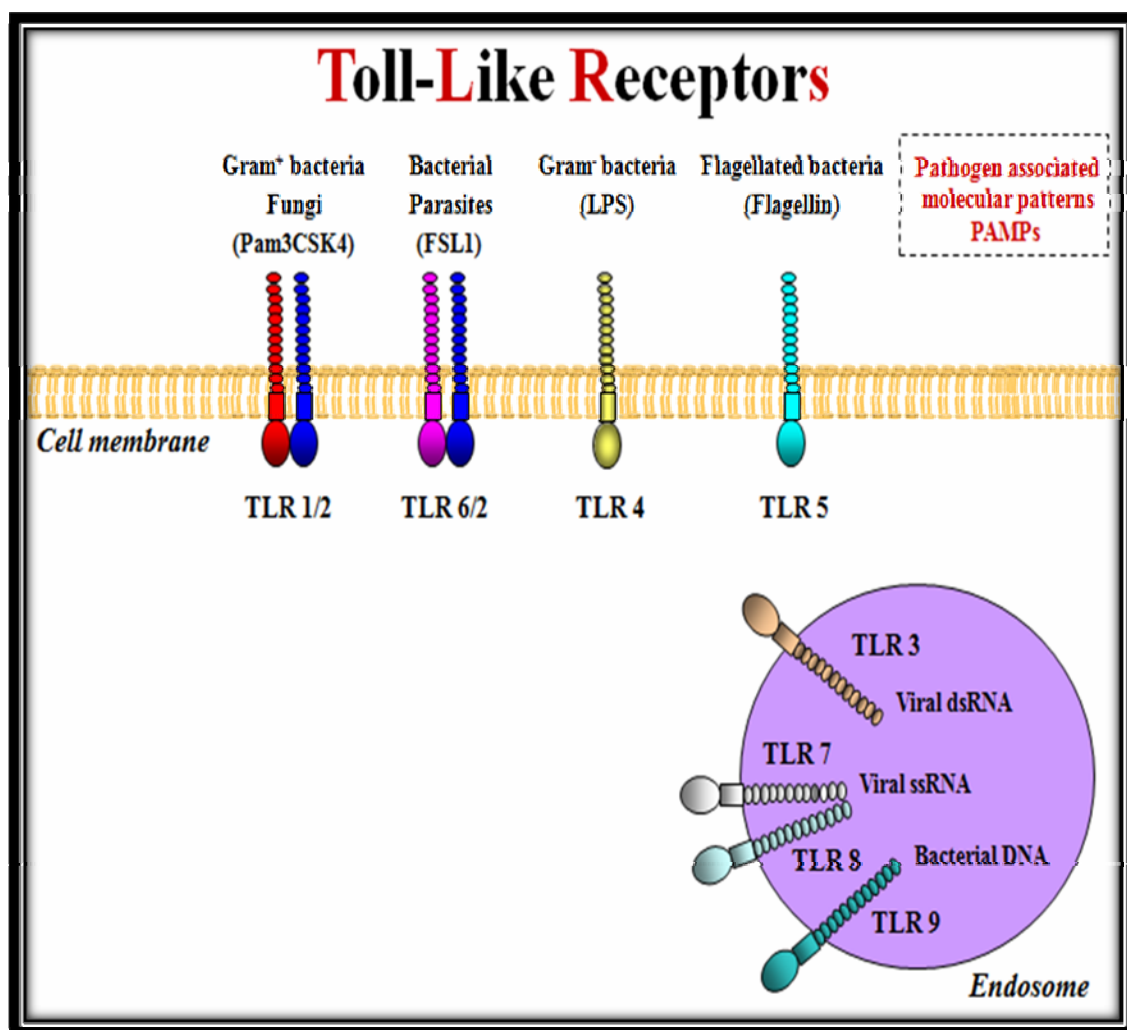
Après activation, les TLRs engagent plusieurs voies de signalisations adressées à tuer les agents pathogènes. Cela stimulera une réponse immunitaire innée contre le microbe, en provoquant une réponse inflammatoire locale qui puisse finalement être en relation avec la génération d'une réponse immunitaire adaptative plus spécifique, médiée par les lymphocytes B (LB) et les lymphocytes T (LT).

### 7.1 Localisation, structure et ligands des TLRs

#### 7.1.1 Localisation des TLRs

Actuellement, 11 TLRs sont identifiés chez l'Homme : TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10 et TLR11 [178]. Ces TLRs sont exprimés dans divers types de cellules du système immunitaire, tel que : les macrophages, les cellules dendritiques, les LB et les LT, les neutrophiles, les cellules NK « Natural Killer », les monocytes et les éosinophiles, ainsi que sur des cellules non immunes, telles que : les fibroblastes, les synoviocytes, les kératinocytes, les cellules endothéliales, les plaquettes, les cellules épithéliales du tractus intestinal, respiratoire et urogénital [179]. Les TLRs sont exprimés au niveau de différents compartiments cellulaires. TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 et TLR11 sont exprimés à la surface cellulaire, tandis que TLR3, TLR7, TLR8 et TLR9 sont exprimés dans des vésicules intracellulaires, telles que le réticulum endoplasmique (RE) et les endosomes (Figure 13) [180].

En fait après stimulation par le microbe, les TLR3, TLR7, TLR8 et TLR9 seront transportés du RE vers les endosomes, via une protéine transmembranaire « Unc-93 homolog B1 » (UNC93B1) localisée dans le réticulum endoplasmique cellulaire [181].



**Figure 13. Les récepteurs Toll-like et leurs ligands.**

Les TLRs sont exprimés au niveau de différents compartiments cellulaires. TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 et TLR11 sont exprimés sur la surface cellulaire. TLR3, TLR7, TLR8 et TLR9 sont exprimés sur les endosomes.

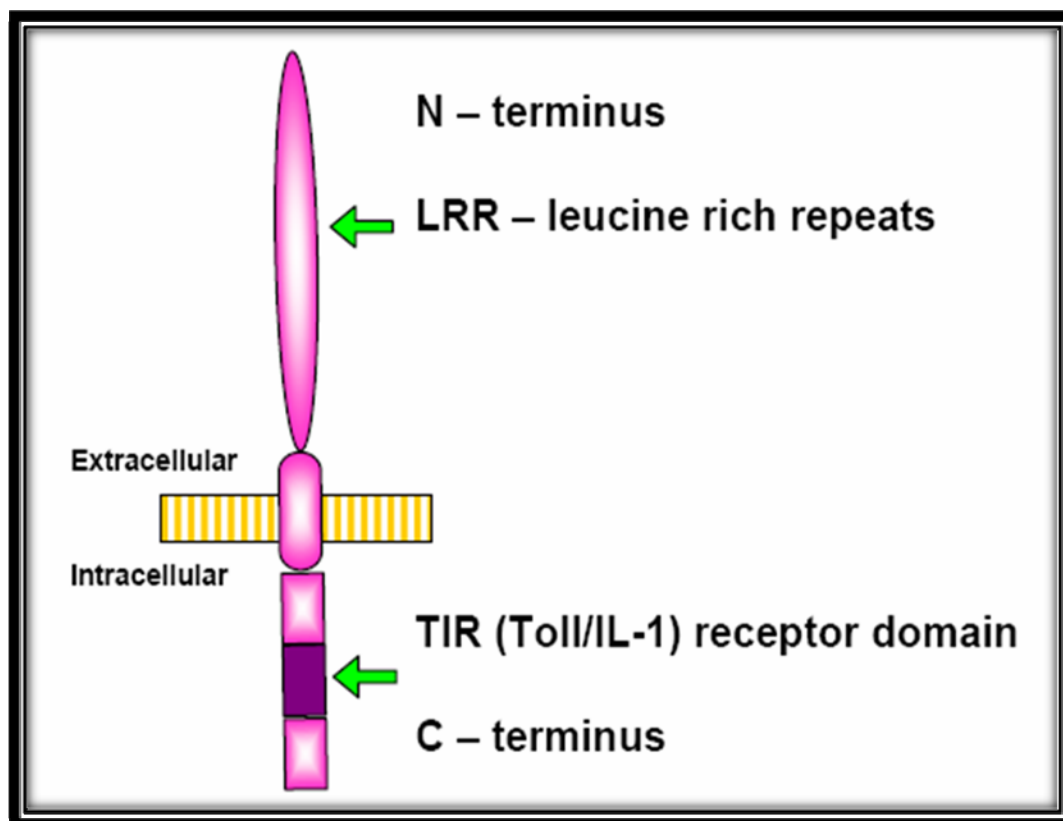
### 7.1.2 Structure des TLRs

Les TLRs sont des glycoprotéines membranaires de type I ayant une structure tertiaire divisée en trois domaines (Figure 14):

- Un domaine extracellulaire responsable de la reconnaissance des PAMPs. Ce domaine est constitué d'un nombre variable de répétitions riches en leucines « Leucine Rich Repeats » (LRR) dont chacun est formé de 20 à 30 acides aminés contenant le motif conservé « xLxxLxLxx » [182].
- Un domaine transmembranaire.
- Un domaine C terminal cytoplasmique comprenant une séquence « Toll/IL-1 Receptor » (TIR) qui ressemble à celle du récepteur de l'interleukine 1 (IL-1), responsable de l'interaction et le recrutement de divers molécules adaptatrices nécessaire pour la transduction du signal [183].

À noter que les TLRs diffèrent essentiellement par leur domaine LRR. Ainsi, TLR2 et TLR4 qui sont deux récepteurs majeurs dans la défense antibactérienne ne possèdent que 24% d'homologie au niveau de leurs domaines extracellulaires [184].





**Figure 14. Structure des TLRs.**

Les TLRs sont des protéines transmembranaires de type I avec un domaine extracellulaire riche en leucine nommé leucine rich repeats (LRR) et un domaine cytoplasmique nommé Toll-interleukine 1 receptor (TIR) qui est homologue à celui du récepteur d'interleukine 1 (IL-1). Adapté de [185].

### 7.1.3 Ligands des TLRs

L'activation des TLRs est initiée par leur liaison aux PAMPs. Ces derniers sont caractérisés par trois propriétés [186]:

- 1) Leurs structures sont rarement présentes chez les cellules de l'hôte.
- 2) Ils sont communs à de nombreuses espèces de micro-organismes, ce qui permet de reconnaître une énorme diversité des microbes par un nombre restreint de récepteurs.
- 3) Ils sont essentiels à la survie des micro-organismes, ce qui limite l'apparition de mutants échappant à la reconnaissance.

Les TLRs reconnaissent différents types de PAMPs dérivés des bactéries et des champignons pathogènes, des virus et des parasites protozoaires.

a) Les PAMPs bactériens : Les TLRs peuvent détecter différents composants de la paroi cellulaire bactérienne, comme le LPS des bactéries Gram<sup>-</sup> reconnues par TLR4, les peptidoglycanes des bactéries Gram<sup>+</sup> et Gram<sup>-</sup> reconnus par TLR2, les lipoarabinomannanes (LAM) des mycobactéries reconnues par TLR2, les lipopeptides diacyl ou triacyl des bactéries, des mycobactéries et des mycoplasmes reconnus par les hétérodimères TLR2/1 et TLR2/6, les flagellines des bactéries flagellées reconnues par TLR5, et l'ADN génomique bactérien riche en répétition cytosine-guanine (CpG) non méthylées reconnu par TLR9 [187, 188].

b) Les PAMPs fongiques : Des études ont montré que les souris MyD88 « knock-out » (MyD88 étant une protéine adaptatrice essentielle pour la signalisation des TLRs) sont sensibles aux infections fongiques telles que *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus* et *Cryptococcus neoformans*. D'autres analyses ont révélé que plusieurs composantes fongiques sont reconnues par les TLRs, comme les phospholipomannanes et les  $\beta$ -glucanes reconnus par TLR2 et les glucuronoxylomannanes reconnus par TLR4 [178, 187, 189].

c) Les PAMPs viraux : Les virus sont constitués de protéines d'enveloppe et d'acides nucléiques simples brins (sb) et doubles brins (db), qui sont reconnus par des différents TLRs, notamment les TLRs endosomiaux. Les protéines d'enveloppe des virus, telles que le virus respiratoire syncytial (VRS) et le virus de la tumeur mammaire des souris (MMTV) sont reconnues par TLR4 [190]. De plus, les acides nucléiques viraux sont des PAMPs aussi importants : Le génome des virus à ADN, comme l'herpès simplex virus (HSV) et le cytomégalo virus murin (MCMV) contient l'ADN CpG non-méthylé qui est reconnu par TLR9.

Le génome des virus à ARNsb, qui est riche en uridine ou uridine/guanosine est reconnu par TLR7 et TLR8. Pendant leur réplication, les virus à ADNdb et les virus à ARNsb produisent des ARNdb qui seront reconnus par TLR3 [178, 187].

d) Les PAMPs des protozoaires : Plusieurs infections par les protozoaires peuvent toucher l'Homme, telles que la narcolepsie, la maladie de Chagas, la toxoplasmose, le paludisme et la leishmaniose. Ces maladies sont causées respectivement par *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi*, *Toxoplasma gondii*, *Plasmodium falciparum* et *Leishmania*. Les phospholipides glyco-inositol (GPI) et les glycosylphosphatidylinositol (GPI) des Trypanosomes, *Toxoplasma gondii* et *Plasmodium falciparum* sont reconnus par TLR2 et TLR4. D'autre part, les alkylacylglyceroles insaturés des Trypanosomes et les lipophosphoglycane (GPL) insaturés des *Leishmanias* sont reconnus par TLR2. Enfin, l'ADN génomique des espèces des Trypanosomes reconnu par TLR9 [182, 187, 188].

## 7.2 Modulation de la réponse immunitaire par le TLRs

Malgré que l'immunité innée est efficace pour prévenir les infections et réduire la charge pathogène, l'élimination complète de l'invasion microbienne et le contrôle de l'infection sont assurés par l'immunité adaptative. La détection des PAMPs par les TLRs déclenche non seulement l'activation de l'immunité innée, mais également l'immunité adaptative.

### a) Stimulation de l'immunité innée :

Le complexe PAMPs-TLRs entraîne l'activation et le recrutement de diverses cellules impliquées dans la réponse innée, telles que les macrophages, les cellules Natural Killer (NK), les éosinophiles et les cellules dendritiques (CD) [191]. L'activation des cellules NK potentialise leurs activités cytotoxiques en induisant la production des perforines, des peptides antimicrobiens et des cytokines immunostimulatrices, telles que IL-6, IL-8 et IFN $\gamma$  [192].

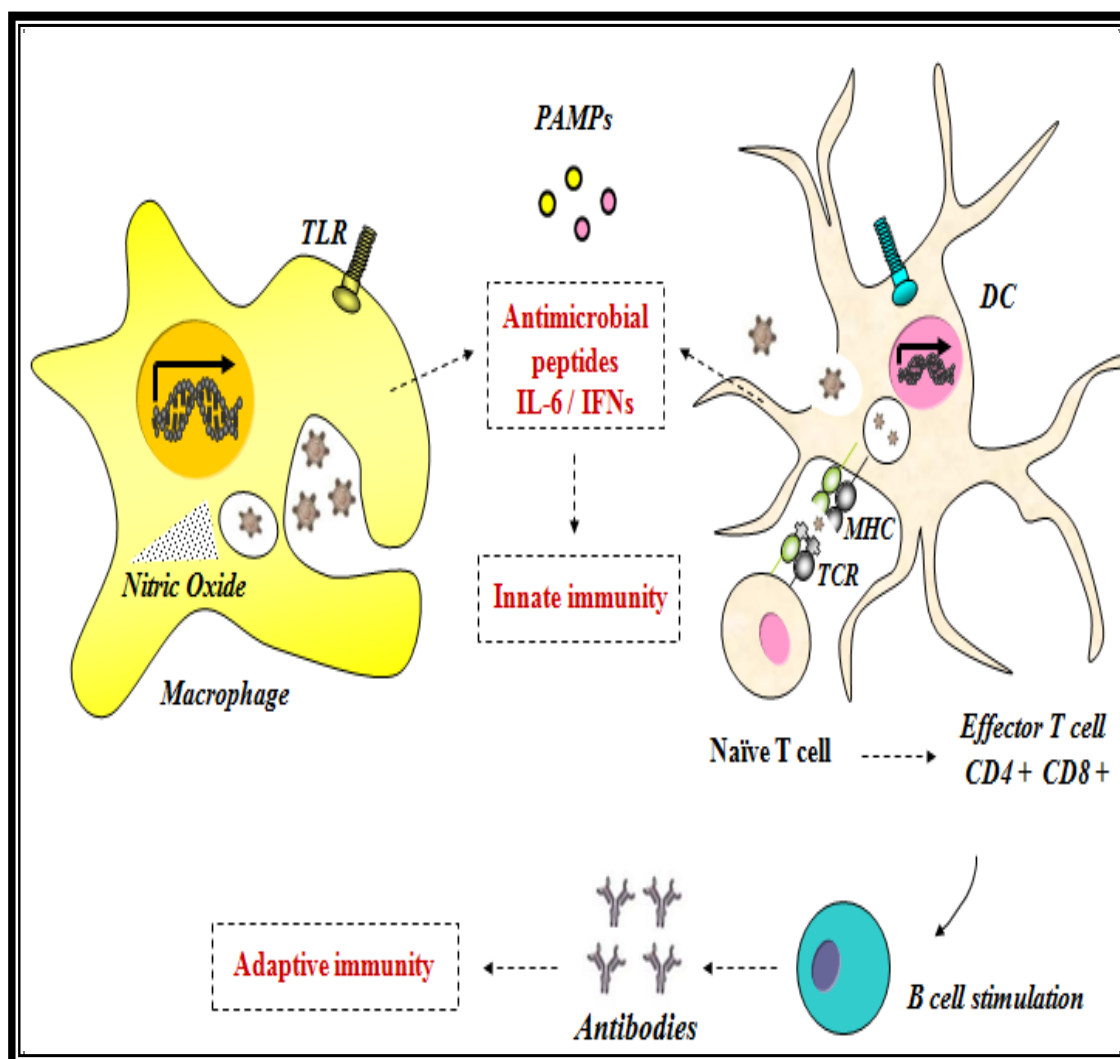
D'autre part, les polynucléaires neutrophiles sont également activés et libèrent leur contenu en granules [193]. Aussi, les polynucléaires éosinophiles produisent du TNF $\alpha$  et de la protéine ECP (eosinophil cationic protein) qui est un médiateur cytotoxique puissant [194]. Par ailleurs, les macrophages réagissent par la sécrétion des cytokines et l'induction des ROI (reactive oxygen intermediates) [195]. Finalement, les CD immatures localisées en périphérie ont une forte capacité d'endocytose ce qui facilite la capture de l'antigène et son acidification [196]. En outre, la maturation des CD par une variété de composants microbiens, est induite par des signaux transmis par les TLRs et se manifeste par l'expression des molécules de costimulation, telles que CD80/CD86 et initient la production de plusieurs médiateurs, tels que TNF- $\alpha$ , les interférons (IFNs), les interleukines (IL-1, IL-6, IL-10, IL-12) et différentes chémokines [179]. Une fois arrivée à échéance, les cellules dendritiques perdent leur capacité d'endocytose et migrent dans les ganglions lymphatiques où elles présentent les antigènes, dérivés des peptides microbiens, complexés au CMH du classe II aux cellules T naïves, initiant ainsi une réponse immunitaire adaptative spécifique [197]. (Figure 15).

Ainsi, les CD qui sont des cellules présentatrices d'antigène (CPA) capables d'activer les LT naïfs se situent à l'interface entre l'immunité innée et l'immunité adaptative [198].

b) Stimulation de l'immunité adaptative :

L'activation des LT peut être directe par stimulation des TLRs exprimés à leur surface, tels que TLR2 et TLR4, ou bien indirecte par l'activation des TLRs des CPA [193]. Ces derniers, surtout les cellules dendritiques, vont orienter la différenciation des LT helper (TH) en TH1 ou TH2 et initier la différenciation des lymphocytes cytotoxiques TCD8. En effet, les CD vont sécréter l'IL-12 et de l'INF, ce qui différencie les TH en TH1, tandis que la différenciation en TH2 est médiée par l'IL-10 [199].

En outre, l'activation des LB par les TLRs augmente leur sécrétion de cytokines. Par exemple, l'activation du TLR2 ou du TLR4, ou bien du TLR9 entraîne la sécrétion d'IL-10 et d'IL-6, tandis que l'activation simultanée des trois TLRs entraîne la sécrétion d'IL-10, l'IL-6 et d'INF $\gamma$  [200]. En plus, l'activation des LB par les TLRs entraîne une augmentation de la production des immunoglobulines et notamment les IgM [201].



**Figure 15. Modulation de la réponse immunitaire par les récepteurs Toll-Like.**

La reconnaissance des agents infectieux par les macrophages et les cellules dendritiques (DC) induit la production des cytokines (IL-6, IFNs) qui déclenchent l'inflammation. Les molécules de costimulation et d'autres cytokines sont également induites, ce qui permettra l'activation des Lymphocyte T et B, et la réponse adaptative.

### 7.3 Voies de signalisation des TLRs

La stimulation des TLRs par les PAMPs stimule l'expression de plusieurs gènes impliqués dans la réponse immunitaire. Les mécanismes moléculaires par lesquels les TLRs induisent l'expression de ces gènes sont actuellement élucidés [202]. L'activation des TLRs facilite leur dimérisation, par exemple TLR2 forme un hétérodimère avec TLR1 ou TLR6, tandis que d'autres TLRs sont censés de former des homodimères [203]. Ainsi, la dimérisation des TLRs déclenche l'activation des voies de signalisations à partir du domaine cytoplasmique [204]. Ce dernier joue un rôle essentiel dans cette activation, puisqu'une mutation dans son gène bloque l'activation du TLR4 par le LPS [205]. Jusqu'à présent, deux voies majeures de transduction du signal sont connues pour les TLRs : la voie MyD88 dépendante et la voie MyD88 indépendante [206] (Figure 16).

#### a) Voie de signalisation dépendante de la protéine MyD88 :

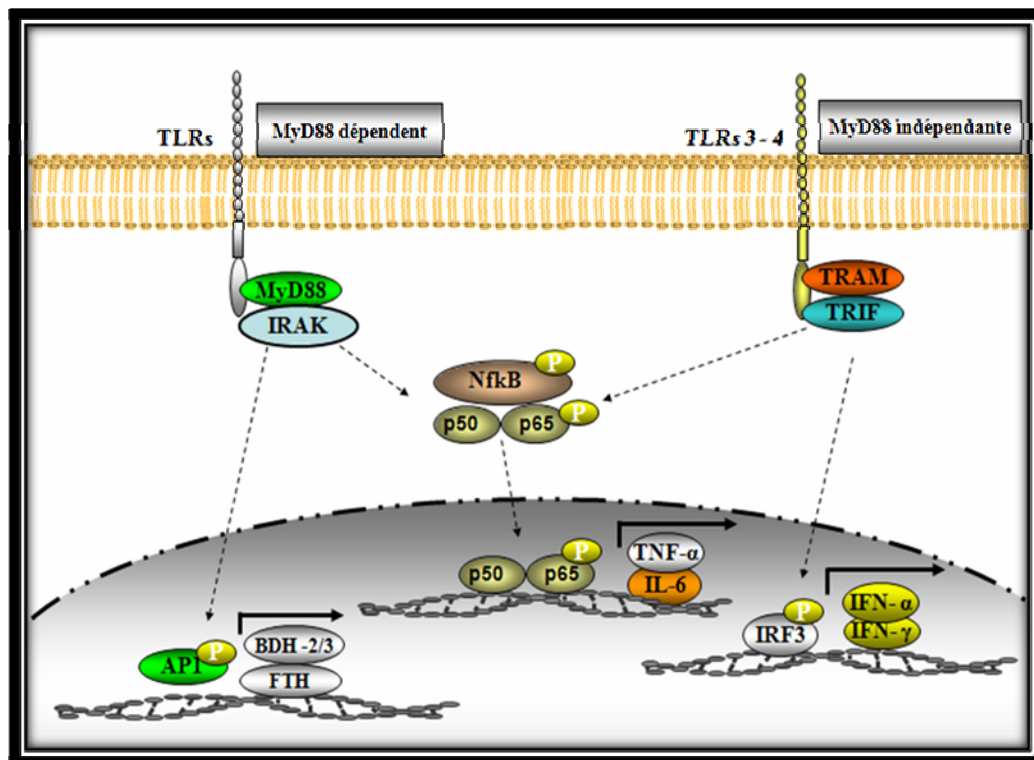
Les TLRs interagissent par l'intermédiaire du domaine TIR avec la protéine adaptatrice MyD88, contenant aussi un domaine TIR [207]. En plus, MyD88 contient un « Death domain » (DD) aminoterminal par l'intermédiaire duquel elle interagit avec les sérine-thréonine kinases du DD de la famille des « IL-1 receptor-associated kinase » (IRAK). Ainsi, la protéine MyD88 fonctionne comme un adaptateur entre le domaine TIR et les kinases impliquées dans la signalisation [208]. Des études sur des souris « knock-out » pour le gène codant MyD88 ont confirmé que cette protéine joue un rôle essentiel dans l'activation des facteurs de transcription NF- $\kappa$ B (nuclear factor  $\kappa$ B) et AP-1 (activator protein-1) [195, 209]. Ces facteurs régulent respectivement l'expression des gènes codant des cytokines inflammatoires comme TNF- $\alpha$  et IL-6, ainsi que l'expression des gènes codant des peptides antimicrobiens, tels que BDH-2/3 (beta-défensine humaine 2/3) et des protéines du métabolisme du fer, telle que la FTH (ferritin heavy chain) [210-213].

b) Voie de signalisation indépendante de la protéine MyD88 :

Des études sur les souris « knock-out » pour le gène codant MyD88 ont également révélé l'existence d'une voie de signalisation indépendante de la protéine MyD88 pour les TLR3 et TLR4 [214, 215]. En effet, l'induction de NF- $\kappa$ B par le LPS (TLR4) et les ARNdb (TLR3) n'est pas abolie chez les souris MyD88<sup>-/-</sup> [216]. Effectivement, TLR3 et TLR4 utilisent une autre protéine adaptatrice, à domaine TIR nommée TRIF ou TICAM-1 [217]. En fait, TLR3 fixe directement TRIF sur son domaine TIR, alors que TLR4 utilise la protéine TRAM comme intermédiaire pour fixer TRIF [202]. Finalement, cette voie de signalisation activera le facteur de transcription NF- $\kappa$ B, ainsi que IRF3 (interferon regulatory factor 3) qui régule l'expression des gènes codant les IFNs [218].

Enfin, l'activation des TLRs entraîne l'activation des facteurs de transcription, tels que NF- $\kappa$ B, AP-1 et IRF3 qui permettent la transcription des gènes codant les cytokines inflammatoires et les costimulateurs déclenchant l'immunité adaptative [210].





**Figure 16. Les voies de signalisation induites par les TLRs.**

Les TLRs induisent une voie de signalisation impliquant la protéine adaptatrice MyD88 et active les facteurs de transcription AP-1 et NF-κB. D'autres TLRs comme TLR3 et TLR4 peuvent également induire une voie alternative impliquant la protéine adaptatrice TRIF pour activer les facteurs de transcription NF-κB et IRF3.

## **8. Rôle des TLRs dans l'expression d'hépcidine et le développement des maladies inflammatoires**

Les micro-organismes qui infectent l'Homme ont besoin de fer pour se développer. Pendant l'infection, le microbe tente d'obtenir le fer en même temps que l'hôte infecté tente de le retenir. En effet, l'augmentation de la quantité du fer favorise la prolifération du microbe, aggrave l'infection et peut entraîner la mort. Ainsi, les altérations du métabolisme du fer durant les maladies infectieuses sont attribuées à des changements dans la réponse immunitaire de l'hôte et à l'effet direct du fer sur la croissance microbienne.

Durant les infections, la production de l'hépcidine est fortement stimulée et affectée. Ceci aura des conséquences sur la quantité de fer dans l'organisme et sur le taux du fer disponible pour le développement des microbes. En effet un taux d'hépcidine est très élevé entraîne la dégradation de la FPN1, une séquestration du fer dans les macrophages et une diminution de l'absorption intestinal du fer. D'une part, cela se présente un avantage pour la défense de l'hôte, comme l'hépcidine assure en même temps deux fonctions, l'activité antimicrobienne et la déprivation en fer des microbes. D'autre part, ceci peut devenir nocif à l'organisme dont l'érythropoïèse sera affectée par l'hyposidérémie, entraînant le développement d'une anémie inflammatoire. Il est donc important de comprendre comment les infections contrôlent l'homéostasie du fer.

Manipuler la synthèse de l'hépcidine dans le but de détourner le fer loin des microbes pourrait être une nouvelle stratégie pour contrôler la prolifération des micro-organismes. Par contre, le développement des anémies inflammatoires poserait un problème majeur qui prédominerait l'activité antimicrobienne de l'hépcidine.

Il est reconnu que les TLRs jouent un rôle majeur dans l'activation du système immunitaire, et surtout dans les maladies infectieuses et les maladies inflammatoires, telles que le lupus érythémateux disséminé, l'asthme, la maladie de Crohn, la sclérose en plaque et l'arthrite rhumatoïde. Des études ont montré qu'au niveau du foie et des macrophages, l'induction de l'hépcidine par du LPS est dépendante du TLR4. En revanche, la façon dont les flux du fer sont gérés lors des infections reste mal comprise. De ce fait, il y a deux questions qui se posent :

1. *Est-ce que l'expression de l'hépcidine macrophagique est contrôlée par divers TLRs ?*
2. *La stimulation des TLRs contribue-t-elle à l'anémie observée dans les maladies inflammatoires et infectieuses en contrôlant la séquestration du fer macrophagique ?*

## **II. OBJECTIFS ET BUTS SPÉCIFIQUES**

## II. OBJECTIFS ET BUTS SPÉCIFIQUES

**Hypothèse :** Étant donné le rôle majeur des TLRs dans la défense immunitaire de l'hôte, ainsi que dans la stimulation de l'hepcidine hépatique à travers le TLR4, nous émettons l'hypothèse que durant les maladies infectieuses et inflammatoires, la production d'hepcidine macrophagique par la voie des TLRs, contrôle la séquestration du fer dans les macrophages.

**Objectif :** L'objectif de ce travail est d'étudier la régulation de l'hepcidine et de la ferroportine dans les macrophages après stimulation des voies TLRs, ainsi que l'effet de cette stimulation sur le développement des hyposidérémies durant la réponse inflammatoire. Afin d'atteindre cet objectif, les buts spécifiques suivants sont proposés :

### **But spécifique 1:**

- Identifier les ligands des TLRs capables d'induire l'hepcidine in vitro dans les macrophages et étudier l'axe fonctionnel hepcidine-ferroportine :

La lignée macrophagique RAW 264.7 et les macrophages péritonéaux murins (MPMs) seront traités avec des ligands TLRs (TLR1-9), et l'expression de l'hepcidine et de la ferroportine sera mesurée par qRT-PCR « quantitative Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction ». Dans ce travail seulement les ligands correspondants au TLR2/1, TLR2/6, TLR3 et TLR4 ont été testés. Les ligands pour TLR5, TLR7, TLR8 et TLR9 seront ensuite étudiés.

### **But spécifique 2:**

- Étudier si l'activation des TLRs est absolument nécessaire à l'induction de l'hepcidine dans les macrophages et déterminer la voie de signalisations utilisée dans cette stimulation.

Après injection intrapéritonéale de thioglycollate, les MPMs seront isolés des souris du type sauvage et des souris *TLR2*<sup>-/-</sup> et *MyD88*<sup>-/-</sup>, et l'expression de l'hepcidine sera mesurée après la stimulation avec des ligands TLRs.

### **But spécifique 3:**

- Etudier *in vivo* l'effet de l'inflammation causée par ces ligands sur la production des cytokines, l'expression de l'hepcidine, la ferroportine et le taux de fer sérique :

Des souris du type sauvage seront injectées avec certains ligands TLRs, et l'expression de l'hepcidine et de la ferroportine hépatique sera mesurée par RT-PCR. Le taux du fer sérique et la saturation de la transferrine (ST%) seront mesurés par colorimétrie.

### **But spécifique 4:**

- Étudier *in vitro* l'effet du taux du fer sur la production d'IL-6 macrophagique en réponse à la stimulation par le TLR4.

Les cellules RAW 264.7 seront traitées avec un chélateur du fer, la desferrioxamine (DFO), ou avec une source du fer, le citrate d'ammonium ferrique (FAC), pour être ensuite stimulées avec du LPS. L'expression d'IL-6 sera mesurée par RT-PCR.

**Intérêt:**

Ces études contribueront à la compréhension des mécanismes impliqués dans la rétention du fer sérique et sa séquestration dans les macrophages durant les maladies inflammatoires et infectieuses.

### **III. MATÉRIELS ET MÉTHODES**



### III. MATÉRIELS ET MÉTHODES

#### **Lignée cellulaire RAW 264.7**

La lignée des macrophages murins, RAW264.7 a été obtenue d'American Type Culture Collection ATCC (Livingstone, MT, USA). Les cellules RAW 264.7 ont été cultivées à 37°C en atmosphère humide contenant 5 % de CO<sub>2</sub>, dans du milieu DMEM (Dabelcco's Modified Eagle Medium) (Wisent, Qc, Canada) contenant 4.5 g/l de glucose, 4 mM de glutamine et 1.5 g/litre de bicarbonate supplémenté à l'aide de 10% de sérum de veau fœtal (FBS) (Gibco, NY, USA) et 1% de pénicilline et streptomycine (PS). 24 heures avant le jour de l'expérience, 10<sup>6</sup> cellules RAW264.7 ont étéensemencées dans des plaques de 6 puits, dans le milieu DMEM mentionné ci-dessus. Au jour de l'expérience, après un lavage avec de PBS (Phosphate-Buffered Saline), le milieu de culture a été changé pour un milieu DMEM similaire mais avec du FBS désactivé par la chaleur.

#### **Isolation et culture des macrophages péritonéaux murins (MPMs)**

Après 3 jours d'injection intrapéritonéale (i.p.) de 1 ml de thioglycollate 3,8%, les souris ont été sacrifiées par dislocation cervicale sous anesthésie avec le pentobarbital de sodium. Premièrement, toutes les régions externes de la souris ont été désinfectées avec éthanol 70%. Cela a été suivi d'une petite incision au centre de l'abdomen pour se débarrasser de la peau, afin que la cavité intrapéritonéale soit exposée. En utilisant une seringue de 5 ml et du PBS, des lavages de la cavité péritonéale ont été fait, en faisant attention de ne pas crever les organes. Le liquide de lavage obtenu permet de récupérer les MPMs de la cavité péritonéale. Ces derniers ont été mis en suspension dans un tube conique de 50 ml place sur glace. Après centrifugation, le culot a été traité avec un tampon de lyse des globules rouges (Gentra Systems, Minneapolis, MN, USA) a été placé sur glace pendant 15 minutes. Enfin, après une centrifugation de 5 minutes à une force centrifuge de 350 g, le culot a été suspendu dans du milieu RPMI contenant 10% de FBS, 1% de PS et incubé à 37°C.

### **Marquage de surface du F4/80 et analyse de cytométrie en flux (FACS)**

Après isolation des MPMs, les cellules ont été lavées et resuspendues dans 2 ml d'un tampon de lavage composé de PBS (Wisent) contenant 0.1% Serum Bovine Albumin (BSA) (Fisher, Pittsburgh, USA) et 0.1% sodium azide ( $\text{NaN}_3$ ) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) de manière à avoir  $10^6$  cellules par tube. Pour bloquer la liaison d'anticorps non spécifiques aux récepteurs  $\text{Fc}\gamma$  normalement exprimés à la surface des macrophages, chaque tube a été incubé pendant 10 minutes à 4°C avec 50  $\mu\text{L}$  de la solution de blocage (200  $\mu\text{L}$  de la solution de lavage + 1  $\mu\text{L}$  d'anticorps  $\text{Fc}\gamma$  anti-mouse CD16/CD32) (PharMingen, Mississauga, ON, CA). Après rinçage et centrifugation, les cellules ont été incubées pendant 1 heure à 4°C avec l'anticorps F4/80-PE (Caltag, CA, USA) (50  $\mu\text{L}$  de la solution de lavage + 1  $\mu\text{L}$  d'anticorps F4/80). Après suspension des cellules dans 250  $\mu\text{L}$  du tampon de lavage, l'analyse par cytométrie de flux des niveaux d'expression du récepteur F4/80 a été réalisée sur Coulter Epics XL-MCL (BeckmanCoulter, Mississauga, ON, Canada).

### **Traitement des cellules RAW 264.7 et des MPMs**

Pour déterminer les ligands TLRs capables d'induire l'expression d'hepcidine dans les macrophages, les cellules RAW 264.7 et les MPMs ont été traitées et incubées à 37°C avec les ligands TLRs suivants :

- Lipoprotéine bactérienne « Pam3CSK4 0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  » (InvivoGen, San Diego, USA), ligand pour l'hétérodimère TLR2/TLR1.
- Lipoprotéine synthétique « FSL1 100  $\text{ng}/\text{ml}$  » (InvivoGen), ligand pour l'hétérodimère TLR2/TLR6.
- Polyionosine-polycytidylic acid « Poly(I:C) 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  » (InvivoGen), ligand pour l'homodimère TLR3.
- Lipopolysaccharide de la souche *Escherichia coli* 055:B4 « LPS 100  $\text{ng}/\text{ml}$  » (endotoxine < 0.125 EU/mg) (Sigma-Aldrich), ligand pour l'homodimère TLR4.

Pour étudier durant les infections l'effet du taux du fer sur la production d'IL-6 macrophagique, les cellules RAW 264.7 ont été traitées pour 24 heures avec 200µM du DFO (Mayne Pharma, Montréal, Canada) ou bien avec 20µM de FAC (Fisher Scientific Lt., Montréal, Canada), pour être ensuite stimulées avec 100 ng/ml du LPS durant 4 heures.

### **Souches des souris**

Toutes les procédures ont été effectuées conformément aux lignes directrices du Conseil Canadien de Protection des Animaux (CCPA), après l'approbation par le Comité Institutionnel de Protection des Animaux (CIPA) du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM). Les souris femelles C57BL/6 de type sauvage âgées entre 4 et 8 semaines ont été achetées auprès de Charles River Laboratories, Inc (Wilmington, MA, USA). Les souris femelles *Tlr2<sup>tm1Kir</sup>* de souche B6 ont été achetées de Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME, USA). Les souris *MyD88<sup>-/-</sup>* ont été fournies par Dr. Shizuo Akira (Osaka University, Japan). Toutes les souris ont été logées dans un secteur stérile.

### **Traitement des souris**

Pour déterminer si les ligands TLRs testés *in vitro* peuvent activer l'expression d'hepcidine et induire une hyposidérémie *in vivo*, chaque groupe de souris femelles C57BL/6 de type sauvage âgées de 8 semaines a été injecté par voie i.p. avec un des ligands TLRs suivants :

- LPS 1 µg/g (Sigma-Aldrich, St Louis) de la souche *Escherichia coli* 055:B5
- FSL1 2 µg/g (InvivoGen)
- Pam3CSK4 100 µg/g (InvivoGen)
- Poly I: C 5 µg/g (InvivoGen)

Le groupe contrôle a été injecté avec du chlorure de sodium (NaCl). Après 6 heures d'injection, les souris ont été sacrifiées par dislocation cervicale sous anesthésie avec le pentobarbital de sodium, ensuite on a collecté le sang dans des tubes secs (Sarstedt, QC, Canada) et les tissus dans du RNALater (Qiagen, Mississauga, ON, Canada).

### **ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)**

Pour mesurer le taux d'interleukine-6 et du TNF-alpha dans le sérum des souris Wt, on a utilisé respectivement les kits d'ELISA M6000B et MTA00 (R&D, Minneapolis, USA). Ce test quantitatif utilise la technique sandwich immuno-enzymatique. En premier lieu, un anticorps monoclonal spécifique de la cytokine cherchée a été incubé dans la microplaque. Ensuite, les standards, les contrôles et les échantillons sont pipetés dans les puits. Ainsi, les cytokines présentes dans le serum seront liées par les anticorps spécifiques immobilisés dans les puits. Après lavage, un anticorps spécifique marqué avec une enzyme est ajouté dans les puits. Suite à un lavage qui élimine les anticorps non-consolidés, une solution de substrat est ajoutée dans les puits. L'enzyme induira une réaction qui donne un produit bleu qui vire au jaune lorsque la solution d'arrêt de réaction est ajoutée. L'intensité de la couleur mesurée est proportionnelle à la quantité de cytokine liée à l'étape initiale. Les valeurs des échantillons sont ensuite déterminées par rapport à la courbe standard.

### Mesure de l'expression de l'hepcidine par qRT-PCR

L'ARN total a été extrait avec du Trizol (Invitrogen, Burlington, ON, Canada) et la synthèse du cDNA a été effectuée par transcription inverse (RT) à l'aide du kit OmniscriptRT (Qiagen) en utilisant des amorces aléatoires et l'inhibiteur de la RNase (Invitrogen). Les niveaux de l'hepcidine (Hamp) ont été mesurés par PCR en temps réel après 45 cycles dans un rotor Gene 3000 Real Time DNA Detection System (Montréal Biotech Inc, Kirkland, QC, Canada) avec le QuantiTect SYBRGreen I PCR kit (Qiagen). Les amorces ont été conçues avec le logiciel Primer3 d'une façon à inclure au moins un intron. Pour chaque paire d'amorces, les fragments d'ADNc amplifiés ont été vérifiés sur gel d'agarose pour confirmer l'absence de l'intron sur le fragment amplifié et l'absence de produits non-spécifiques. Dans cette étude, les amorces suivantes ont été utilisées :

*β-actine*, 5'-TGTTACCAACTGGGACGACA-3'

5'-GGTGTGAAGGTCTCAA-3'

*Hepcidine*, 5'-AGAGCTGCAGCCTTTGCAC-3'

5'-GAAGATGCAGATGGGGAAGT-3'

*Ferroportine*, 5'-CCCATCCCCATAGTCTCTGT-3'

5'-CTTGCAGCAACTGTGTCACC-3'

La quantification relative a été effectuée en utilisant les courbes d'étalonnage construits à partir de dilutions en série de produits de PCR. Toutes les courbes standard générées ont été trouvées d'avoir une excellente efficacité d'amplification par PCR (90% - 96%, 100% indique que, après chaque cycle, le montant de modèle est doublée), tel que déterminé par leurs pentes. L'expression de l'ARNm de chaque gène a été déterminée par comparaison directe avec la courbe standard, faite à partir du produit de PCR du gène cibles, générée dans chaque série de PCR. Les niveaux d'expression ont été normalisés par rapport au gène de contrôle *β-actine*.

### **Western Blot pour la détection de la ferroportine dans le foie des souris sauvages**

Les concentrations des extraits des protéines et du foie des souris sauvages ont été mesurées grâce au BCA Protein Assay Kit (Pierce, Rockford, IL). Les protéines ont été dénaturées pendant 10 minutes à 100°C dans du tampon de chargement contenant du Tris-HCl, du dithiotreitol (DTT), du sodium dodecyl sulfate (SDS), du glycérol et de bleu de bromophénol. Des montants équivalents de protéines ont été chargés pour effectuer une électrophorèse sur un gel de polyacrylamide. Ensuite, ces protéines ont été transférées du gel sur une membrane de nitrocellulose (Hybond-C super, Amersham). Les blots ont été bloqués par incubation d'une heure avec une solution contenant 5% de lait. Après le blocage, les blots ont été incubés à température pièce pendant 1 heure avec les anticorps primaires suivant: anti-FPN1 de souris (1:10000) (Alpha Diagnostic, San Antonio, USA) et anti- $\beta$ -actine de souris (Abcam, Cambridge, UK) (1:5000). Après lavages, les blots ont été incubés pendant 1 heure avec un anticorps secondaire marqué à la peroxidase (Amersham) (1:2000). Les anticorps secondaires couplés à la peroxidase ont été détectés avec la solution ECL (Amersham).

### **Mesure des paramètres du fer dans le sérum des souris sauvages**

Sous anesthésie avec le pentobarbital de sodium, le sang a été prélevé du sinus orbital des souris sauvages. Après centrifugation du sang total, le fer sérique (FS), la capacité totale de fixation du fer (CTFF) et la ST% ont été mesurées par une méthode colorimétrique avec le système Kodak Ektachem DT60 (Johnson & Johnson, Ortho Clinical Diagnostics, Mississauga, ON, Canada).

### **Analyses statistiques**

Tous les résultats sont représentés sous forme de moyenne  $\pm$  SEM. Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide de l'analyse de variance à un facteur (ANOVA). Les valeurs de  $p < 0.05$  ont été considérées comme significatives, tandis que les valeurs de  $p > 0.05$  ont été considérées comme non significatives « ns ». Le groupe contrôle a été désigné par CTRL.

## **IV. RÉSULTATS**

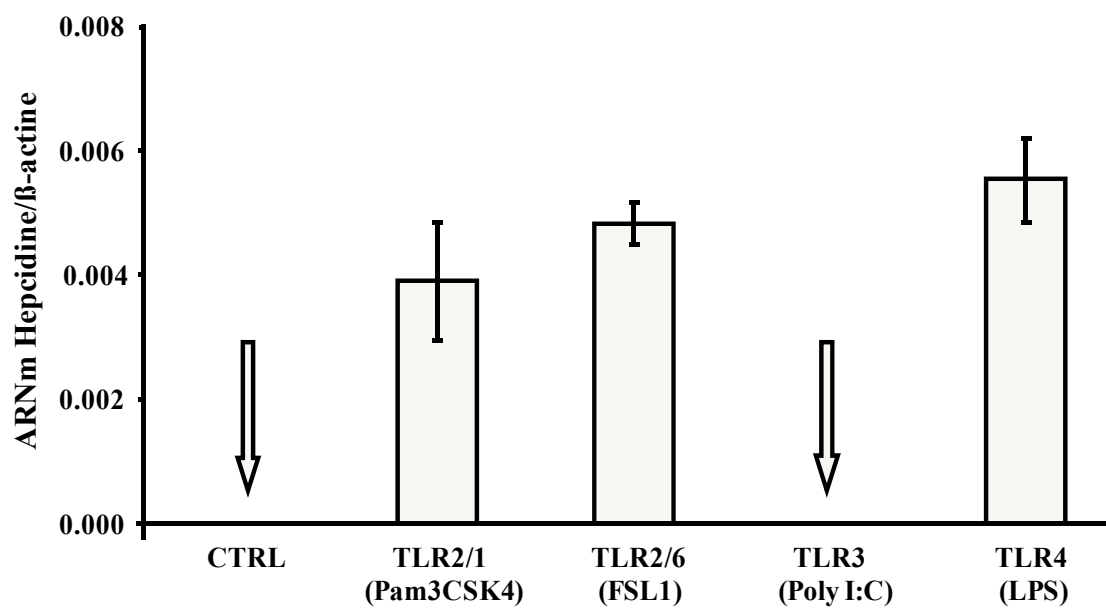
## IV. RÉSULTATS

- 1. Les ligands des TLRs activent l'expression de l'hepcidine dans les macrophages RAW 264.7 :

Des études préalables dans notre laboratoire ont montré que l'expression de l'hepcidine par les macrophages lors de la stimulation avec du LPS est dépendante du TLR4 [176]. Pour déterminer si d'autres ligands des TLRs sont capables d'induire l'hepcidine macrophagique, on a utilisé la lignée des macrophages RAW 264.7. Cette lignée de cellules tumorales est dérivée du liquide d'ascite d'une souris présentant des tumeurs induites par injection intrapéritonéale d'Abselon leukemia virus.

Après un traitement de 24 heures avec les ligands Pam3CSK4, FSL1, Poly(I:C) et LPS qui correspondent respectivement au TLR2/1, TLR2/6, TLR3 et TLR4, l'ARN total extrait des cellules RAW 264.7 a été soumis à une qRT-PCR. L'analyse des résultats a montré que les macrophages non-traités (groupe du contrôle négatif) étaient incapables d'exprimer l'hepcidine, de même pour les macrophages traités avec le ligand Poly(I:C). Par contre, l'expression d'hepcidine a été observée chez les macrophages traités avec les ligands Pam3CSK4 et FSL1, ainsi que dans les macrophages traités avec du LPS (groupe du contrôle positif), (figure 17).



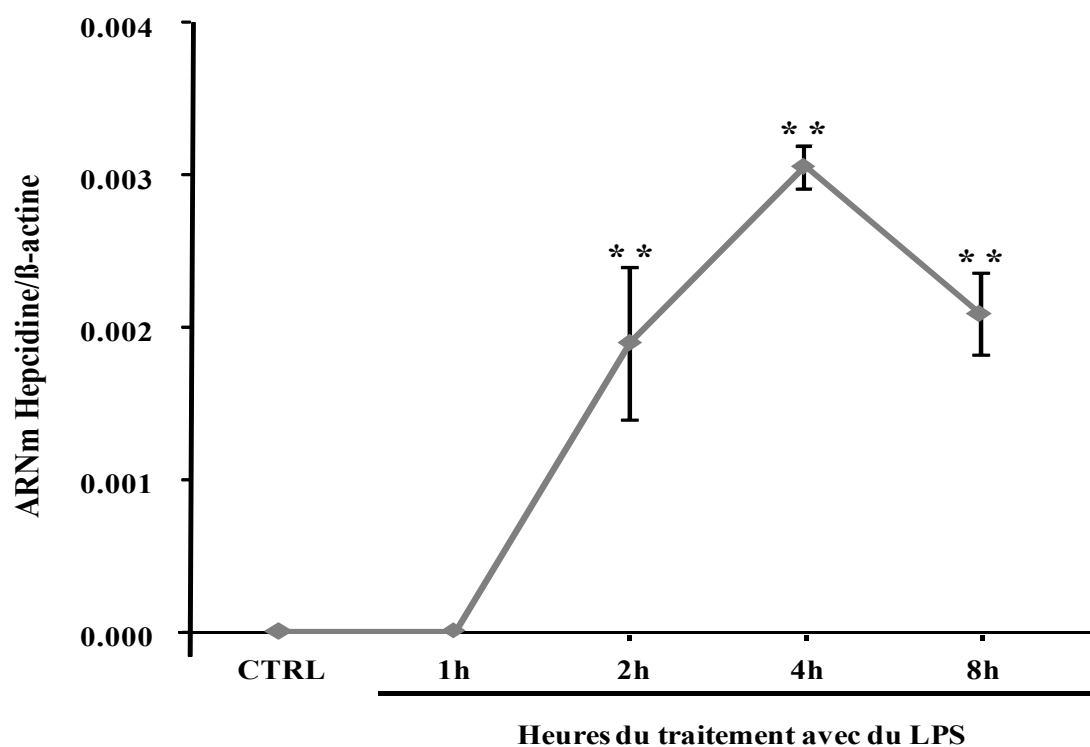


**Figure 17. Expression de l'hepcidine dans les macrophages RAW 264.7.**

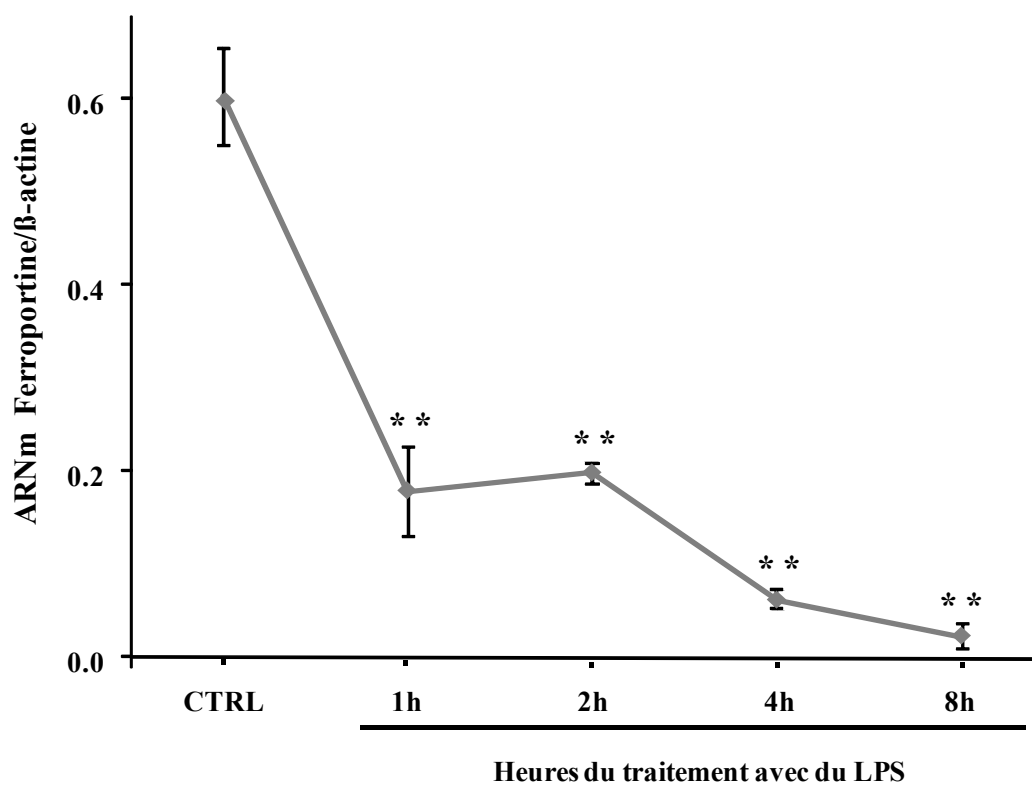
Après un traitement de 24h par les ligands Pam3CSK4, FSL1, Poly(I:C) et LPS, l'expression de l'hepcidine dans les macrophages RAW 264.7 a été évaluée en utilisant la qRT-PCR. (n=3).

- 2. L'induction de l'hepcidine dans les macrophages RAW 264.7 diminue l'expression de la ferroportine :

Après avoir déterminé les ligands capables d'induire l'hepcidine dans les cellules RAW 264.7, on voulait faire une étude cinétique sur l'induction de HAMP et son effet sur l'expression de la ferroportine. Après traitement avec du LPS (CTRL, 1h, 2h, 4h, 8h), l'ARN total extrait des cellules RAW 264.7 a été soumis à une qRT-PCR. L'analyse des résultats a montré que l'induction de l'hepcidine dans les macrophages RAW 264.7 (figure 18) est accompagnée d'une réduction de l'expression de la ferroportine (figure 19). Ces résultats sont représentatives des expériences montrant que la stimulation avec du LPS active l'expression de HAMP et réprime celle de la ferroportine.



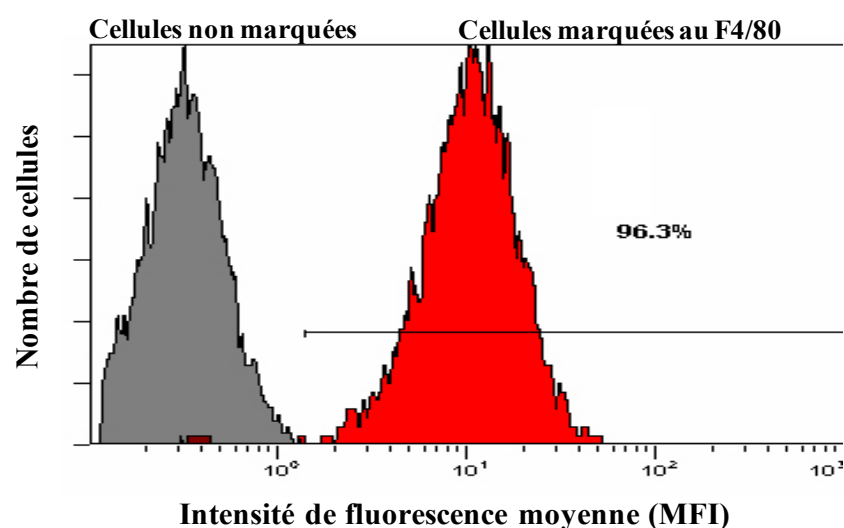
**Figure 18. Étude cinétique de l'expression de l'hepcidine dans les RAW 264.7.** Après traitement avec du LPS (CTRL, 1h, 2h, 4h, 8h), l'expression de l'hepcidine dans les macrophages RAW 264.7 a été évaluée en utilisant la qRT-PCR. (n=1).  
 \*\*p < 0.01.



**Figure 19. Étude cinétique de l'expression de la ferroportine dans les RAW 264.7.** Après traitement avec du LPS (CTRL, 1h, 2h, 4h, 8h), l'expression de la ferroportine dans les macrophages RAW 264.7 a été évaluée en utilisant la qRT-PCR. (n=1). \*\*p < 0.01.

- 3. Similairement aux résultats obtenus avec les RAW 264.7, les ligands des TLRs activent l'expression de l'hepcidine dans les MPMs :

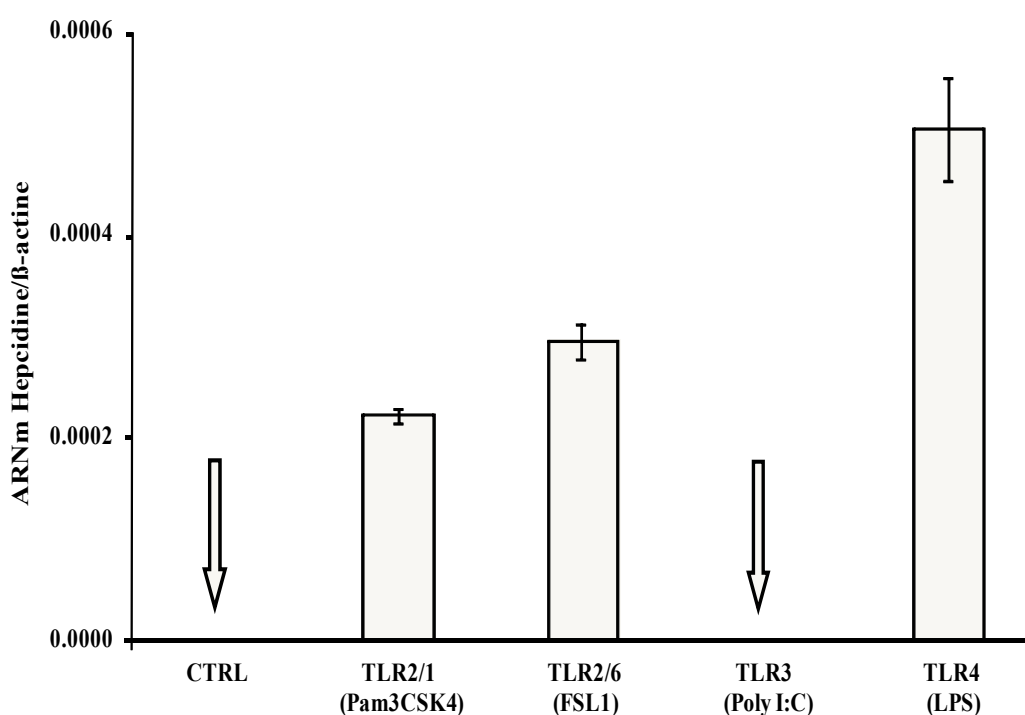
Après avoir déterminé les ligands des TLRs capables d'induire l'hepcidine dans les macrophages RAW 264.7, on voulait tester si ces mêmes ligands sont capables de stimuler l'expression de l'hepcidine dans les macrophages primaires péritonéaux (MPMs). Pour déterminer le pourcentage en macrophages des cellules isolées de la cavité intrapéritonéale des souris sauvages, ces cellules étaient marquées avec l'anticorps monoclonal F4/80 qui est un marqueur spécifique des macrophages murins. Au moyen de l'analyse par FACS, nous avons constaté que le pourcentage des cellules exprimant à leur surface le marqueur F4/80 est  $> 95\%$ , ce qui confirme que la majorité des cellules isolées sont des macrophages (Figure 20).



**Figure 20. Marquage de surface du F4/80 et analyse par FACS.**

Les cellules isolées de la cavité intrapéritonéale des souris sauvages étaient marquées avec l'anticorps monoclonal F4/80 et analysées par FACS. La MFI (intensité moyenne de fluorescence) a été utilisée pour mesurer le pourcentage des cellules exprimant le F4/80. L'histogramme en rouge représente les cellules marquées au F4/80 et celui en gris représente les cellules non-marquées. (n=2).

Pour déterminer si les ligands Pam3CSK4, FSL1, Poly(I:C) et LPS sont capables d'induire l'hepcidine dans les MPMs, on a procédé de manière comparable au traitement des cellules RAW 264.7. L'analyse par qRT-PCR a montré des résultats similaires à ceux observées avec les cellules RAW 264.7. Les MPMs traités avec Pam3CSK4, FSL1 et LPS étaient capables d'exprimer l'hepcidine, contrairement aux MPMs traités avec Poly(I:C) (Figure 21). Ces résultats indiquent que certains ligands des TLRs peuvent induire l'expression de l'hepcidine dans les macrophages.

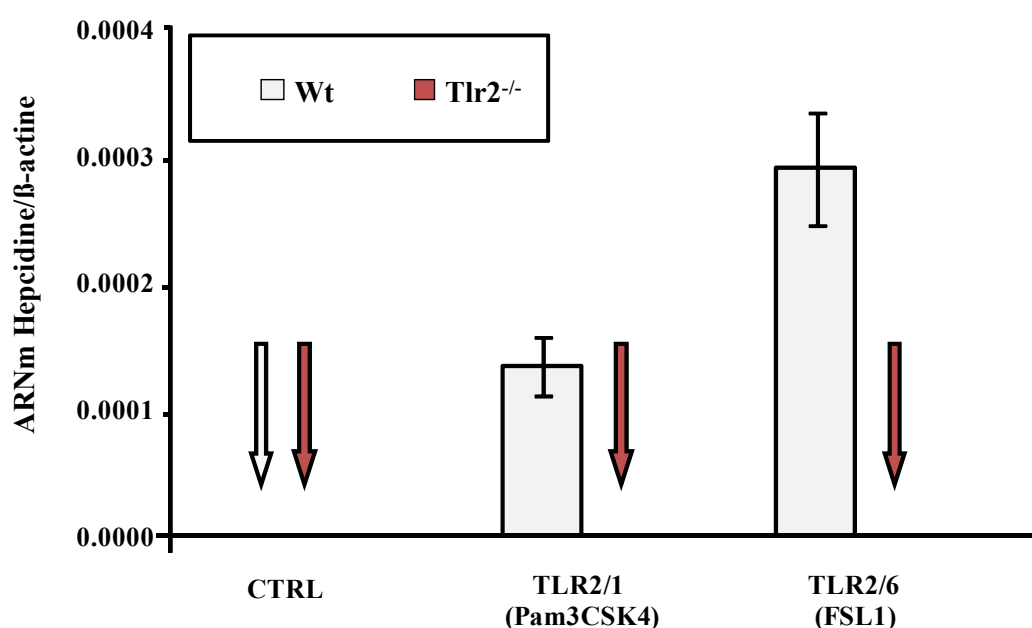


**Figure 21. Expression de l'hepcidine dans les MPMs des souris sauvages.**

Après un traitement de 24h par les ligands Pam3CSK4, FSL1, Poly(I:C) et LPS, l'expression de l'hepcidine dans les MPMs a été évaluée en utilisant la qRT-PCR, qui correspondent respectivement au TLR2/1, TLR2/6, TLR3 et TLR4. (n=3).

- 4. TLR2 est nécessaire pour l'induction de l'hepcidine dans les MPMs par les ligands Pam3CSK4 et FSL1.

Les ligands Pam3CSK4 et FSL1 sont capables d'induire l'expression de l'hepcidine dans les macrophages, mais il se peut que ces ligands activent des voies de signalisations indépendantes des TLRs. Alors, on voulait déterminer la nécessité des TLRs pour assurer cette expression. Pour cela, on a étudié l'expression de l'hepcidine dans les MPMs isolés des souris *TLR2*<sup>-/-</sup>, TLR2 étant le récepteur utilisé par les deux ligands Pam3CSK4 et FSL1. L'analyse par qRT-PCR a montré que les MPMs isolés des souris *TLR2*<sup>-/-</sup> étaient incapables d'exprimer l'hepcidine, contrairement aux MPMs isolés des souris sauvages. Ce résultat confirme que le récepteur TLR2 est nécessaire pour activer la voie de signalisation impliquée dans l'expression de l'hepcidine macrophagique, après stimulation avec les ligands Pam3CSK4 et FSL1 (Figure 22).

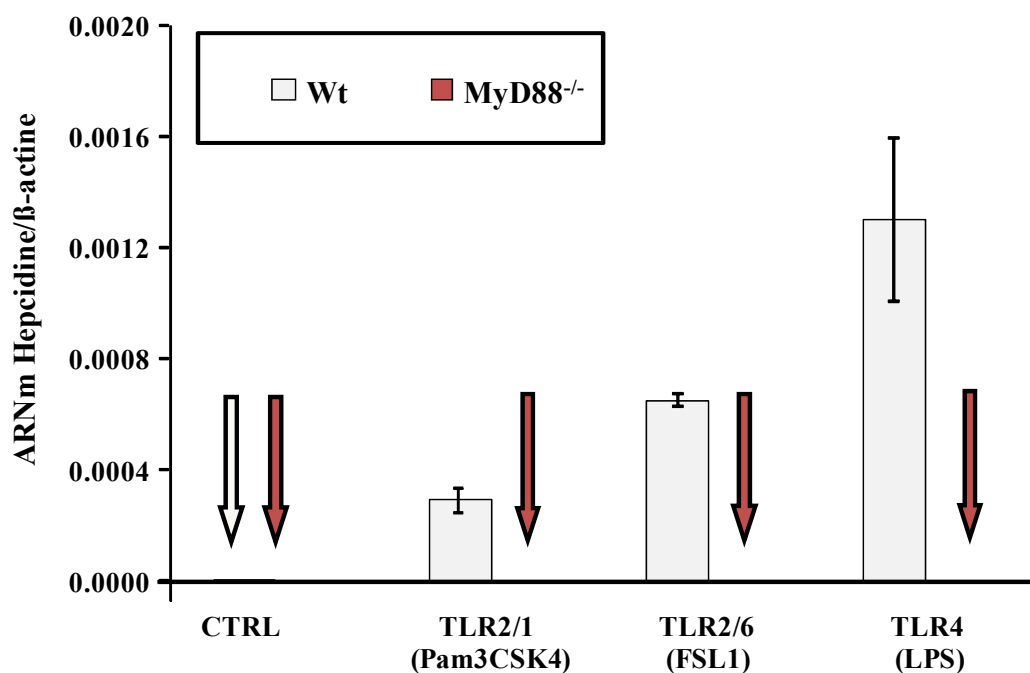


**Figure 22. Expression de l'hepcidine dans les MPMs *TLR2*<sup>-/-</sup>.**

Après un traitement de 24h par les ligands Pam3CSK4, FSL1, l'expression de l'hepcidine dans les MPMs Wt et *Tlr2*<sup>-/-</sup> a été évaluée en utilisant la qRT-PCR. (n=3).

- 5. La protéine adaptatrice MyD88 est nécessaire pour l'induction de l'hepcidine dans les MPMs.

Après avoir déterminé la nécessité des TLRs pour l'induction de l'hepcidine dans les macrophages, on voulait déterminer la voie de signalisation utilisée dans cette induction. Comme il y a deux voies majeures connues pour la signalisation des TLRs : une dépendante et l'autre indépendante de la protéine adaptatrice MyD88, on a étudié l'expression de l'hepcidine dans les MPMs isolés des souris *MyD88*<sup>-/-</sup> après stimulation avec les ligands Pam3CSK4, FSL1 et LPS. L'analyse par qRT-PCR a montré que l'expression de l'hepcidine dans les MPMs *MyD88*<sup>-/-</sup> était complètement abolie. Ce résultat confirme que la voie de signalisation utilisée par TLR2/1, TLR2/6 et TLR4 pour induire l'expression de l'hepcidine est dépendante de la protéine MyD88 (Figure 23).



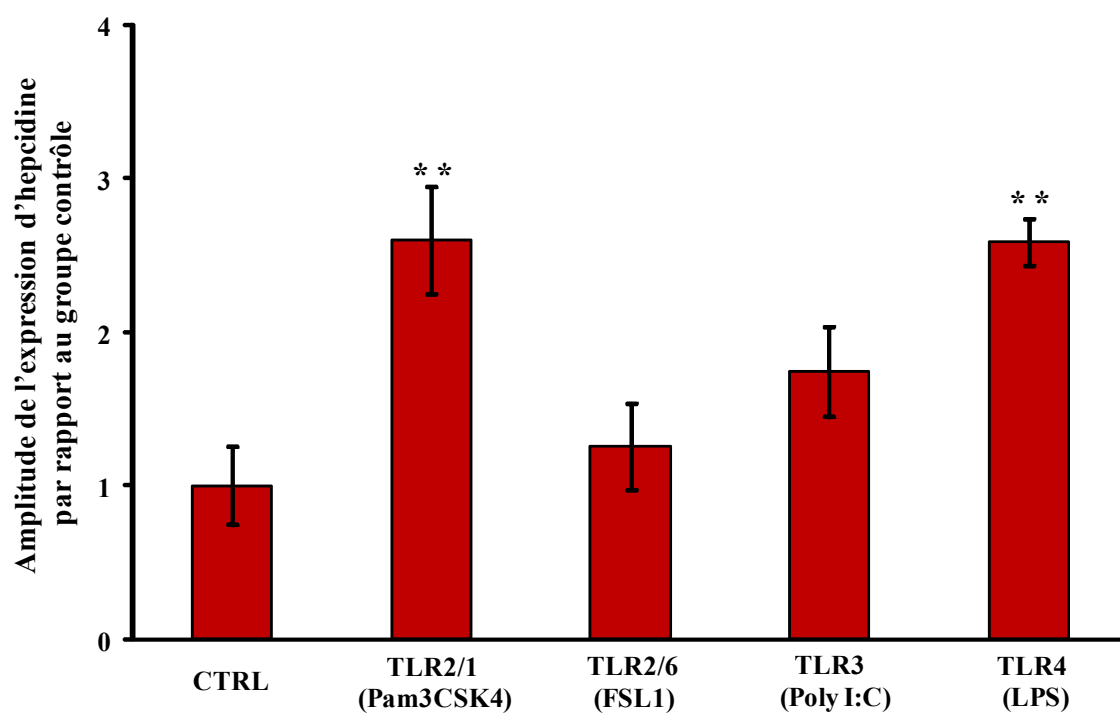
**Figure 23. Expression de l'hepcidine dans les MPMs *MyD88*<sup>-/-</sup>.**

Après un traitement de 24h par les ligands Pam3CSK4, FSL1 et LPS, l'expression de l'hepcidine dans les MPMs *MyD88*<sup>-/-</sup> a été évaluée en utilisant la qRT-PCR. (n=3).

- 6. Certains ligands des TLRs induisent l'expression de l'hepcidine et provoquent une hyposidérémie *in vivo* :

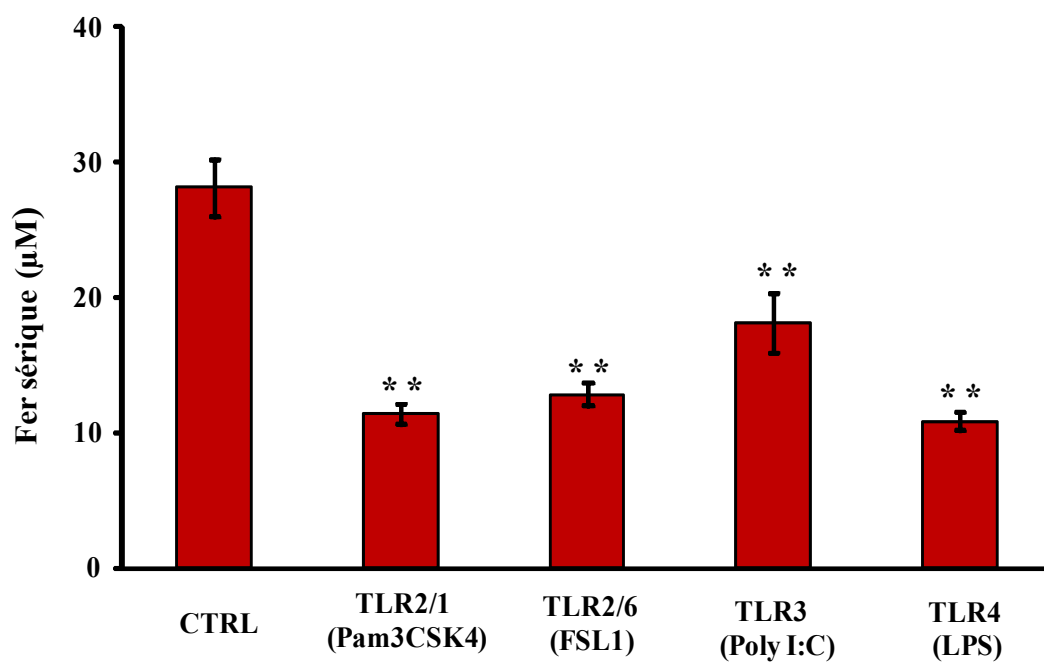
Après avoir déterminé les ligands TLRs capables de stimuler l'expression de l'hepcidine dans les macrophages, ainsi que la voie de signalisation activée dans cette induction, on voulait étudier *in vivo* l'effet de l'inflammation causée par ces ligands sur l'expression de l'hepcidine hépatique, le taux du fer sérique et la ST%. Pour ce faire, on a injecté (i.p.) une dose unique de ces ligands aux souris femelles C57BL/6, soient Pam3CSK4 100 µg/g, FSL1 2 µg/g, Poly I: C 5 µg/g et LPS 1 µg/g, tandis que le groupe contrôle a été injecté avec du NaCl. Après 6 heures d'injection, les souris ont été sacrifiées par dislocation cervicale sous anesthésie avec le pentobarbital de sodium, on a ensuite collecté le sang dans des tubes EDTA et les tissus dans du RNALater. L'analyse par qRT-PCR a montré que l'expression de l'hepcidine hépatique après injection du Pam3CSK4 et LPS est 2 à 3 fois plus élevée que celle observée dans le groupe du contrôle. Par contre, l'expression de l'hepcidine par FSL1 et Poly I:C n'était pas significative par rapport au groupe contrôle (Figure 24). D'autre part, tel que anticipé que dans la plupart des maladies inflammatoires, l'inflammation aiguë causée par ces ligands a diminué de façon significative le taux du fer sérique et la ST%, et cela par rapport au groupe contrôle (Figures 25, 26). Ces résultats indiquent que Pam3CSK4 et LPS sont capables d'induire l'expression de l'hepcidine hépatique et de provoquer une hyposidérémie dépendante de HAMP, tandis que FSL1 et Poly I:C étaient capables de provoquer une hyposidérémie indépendante de HAMP.





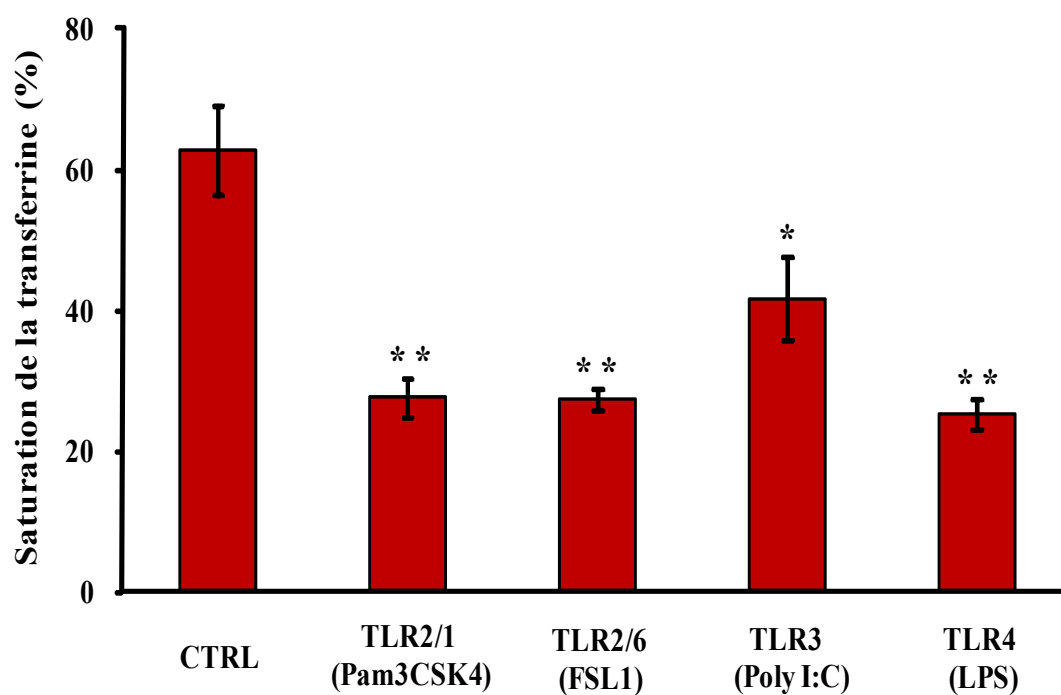
**Figure 24. Expression de l'hepcidine hépatique in vivo.**

Après 6 heures d'injection des ligands Pam3CSK4, FSL1, Poly I:C et LPS aux souris C57BL/6, l'expression de l'hepcidine hépatique a été évaluée en utilisant la qRT-PCR. (6 souris par groupe). \*\* $p < 0.01$ .



**Figure 25. Taux du fer sérique.**

Après 6 heures d'injection des ligands Pam3CSK4, FSL1, Poly I:C et LPS aux souris C57BL/6, le taux du fer sérique a été évalué par une méthode colorimétrique avec le système Kodak Ektachem DT60. (6 souris par groupe). \*\*p < 0.01.

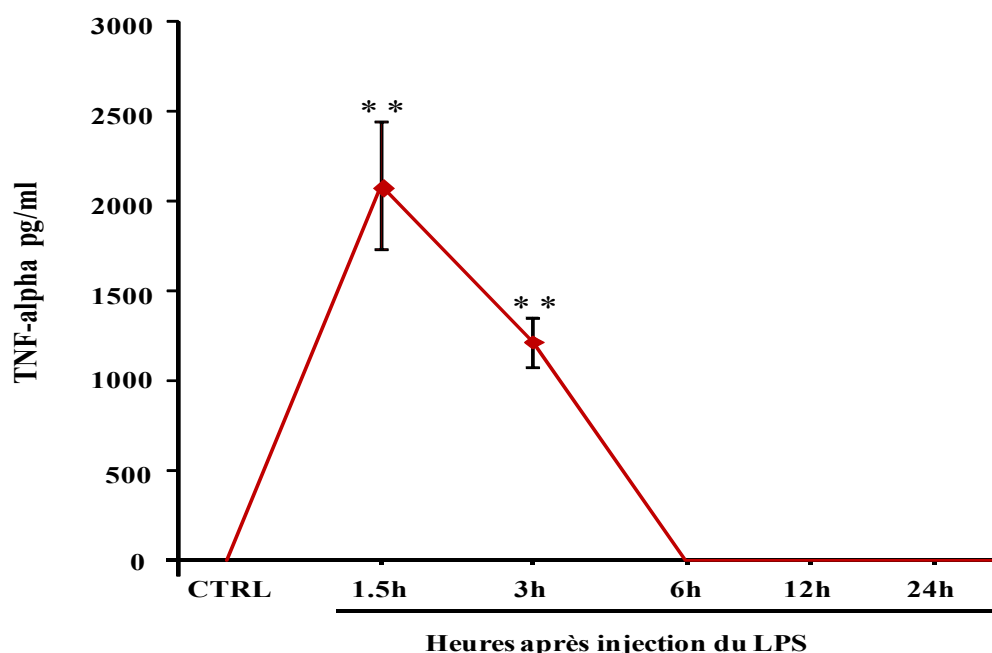


**Figure 26. Saturation de la transferrine.**

Après 6 heures d'injection des ligands Pam3CSK4, FSL1, Poly I:C et LPS aux souris C57BL/6, la ST% a été évaluée par une méthode colorimétrique avec le système Kodak Ektachem DT60. (6 souris par groupe). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .

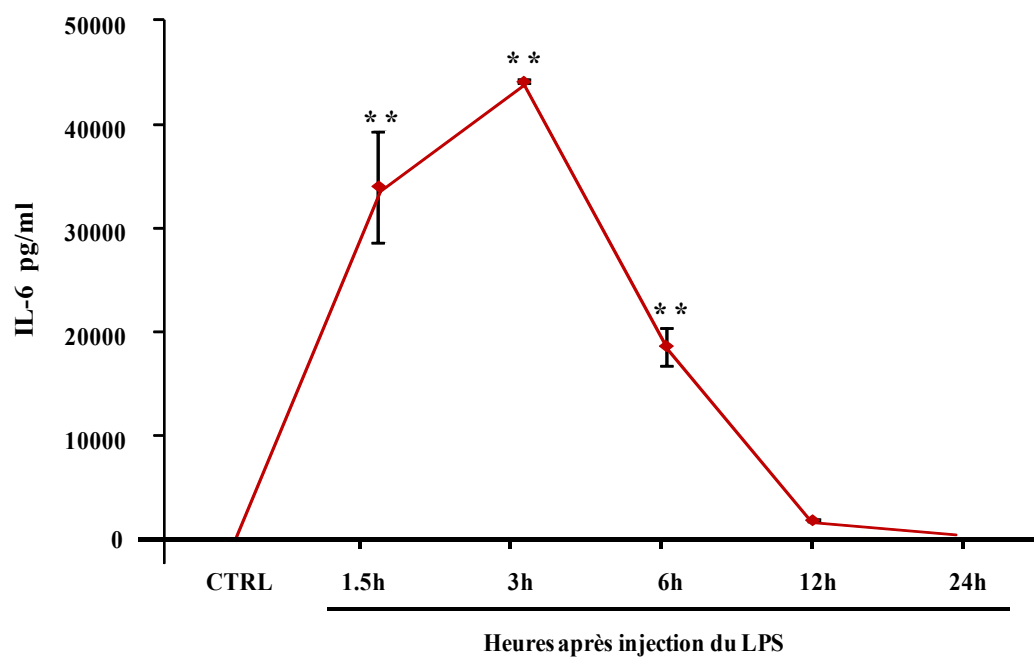
- 7. L'injection des souris Wt avec du LPS induit la production de cytokines qui stimulent l'expression de l'hepcidine hépatique.

Après avoir déterminé les ligands capables d'induire l'hepcidine chez les souris Wt, on voulait faire une étude cinétique portant sur l'induction de l'hepcidine hépatique, l'expression de la ferroportine, le taux du fer sérique et sur l'expression de cytokines, telles que TNF-alpha et IL-6 qui jouent un rôle important dans l'induction de l'hepcidine hépatique et dans le développement des hyposidérémies [139, 175]. Après injection du LPS (CTRL, 1.5h, 3h, 6h, 12h, 24h), l'ARN total extrait du foie des souris sauvages a été soumis à une qRT-PCR. Le taux de TNF-alpha et d'IL-6 a été mesuré par ELISA. L'analyse des résultats a montré que le LPS induit la production de TNF-alpha et d'IL-6 (Figure 27, 28) qui stimule l'hepcidine hépatique (figure 29) qui entraîne une réduction de l'expression de la ferroportine (figure 30, 31, 32), ainsi qu'une diminution du taux du fer sérique et de la saturation de la transferrine (figure 33, 34). Après 6 heures d'injection, l'effet du LPS s'atténue et l'expression de l'hepcidine revient au niveau basal.



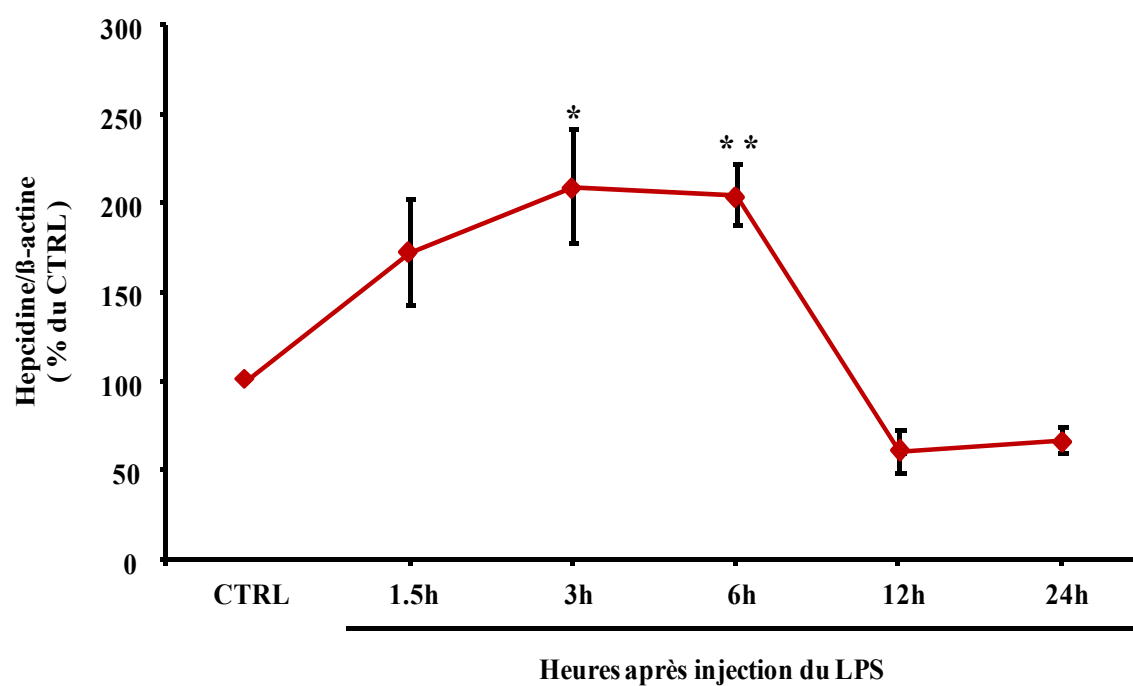
**Figure 27. Taux sérique de TNF-alpha.**

Après injection du LPS aux souris C57BL/6, le taux de TNF-alpha a été évalué par ELISA. (4 souris par groupe). \*\*p < 0.01.



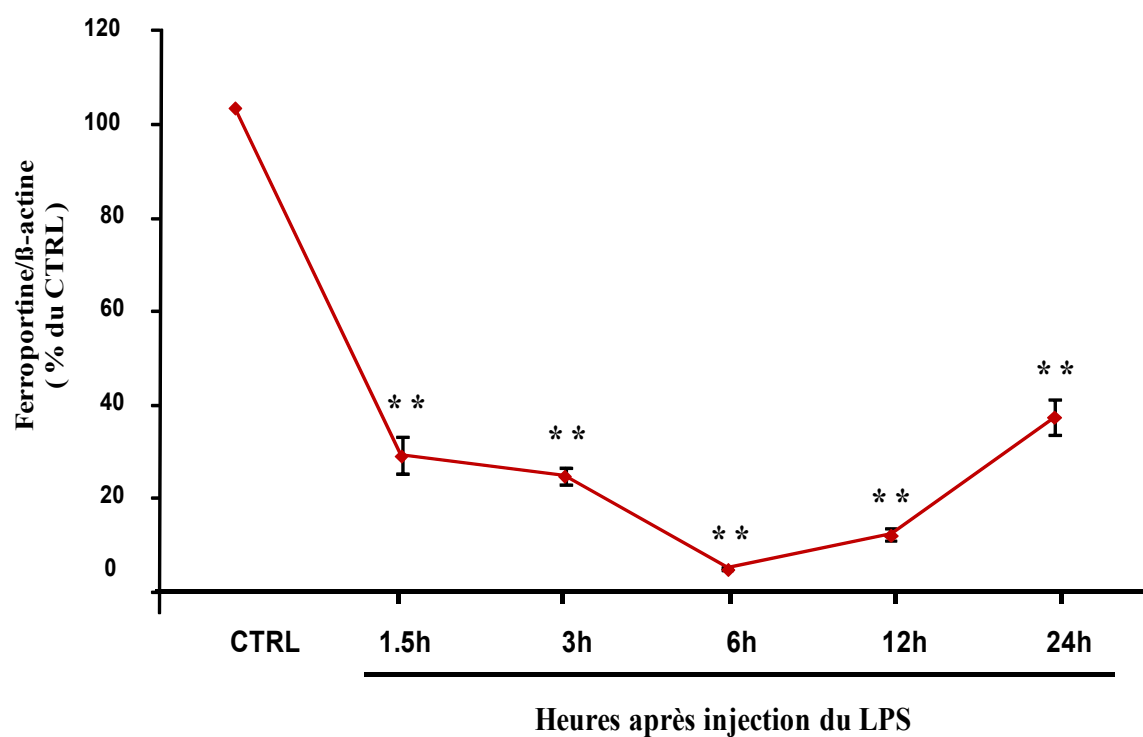
**Figure 28. Taux sérique d'interleukine 6.**

Après injection du LPS aux souris C57BL/6, le taux d'IL-6 a été évalué par ELISA. (4 souris par groupe). \*\* $p < 0.01$ .



**Figure 29. Étude cinétique de l'expression de l'hepcidine hépatique.**

Après injection du LPS (CTRL, 1.5h, 3h, 6h, 12h, 24h), l'expression de l'hepcidine hépatique a été évaluée en utilisant la qRT-PCR. (4 souris par groupe). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .

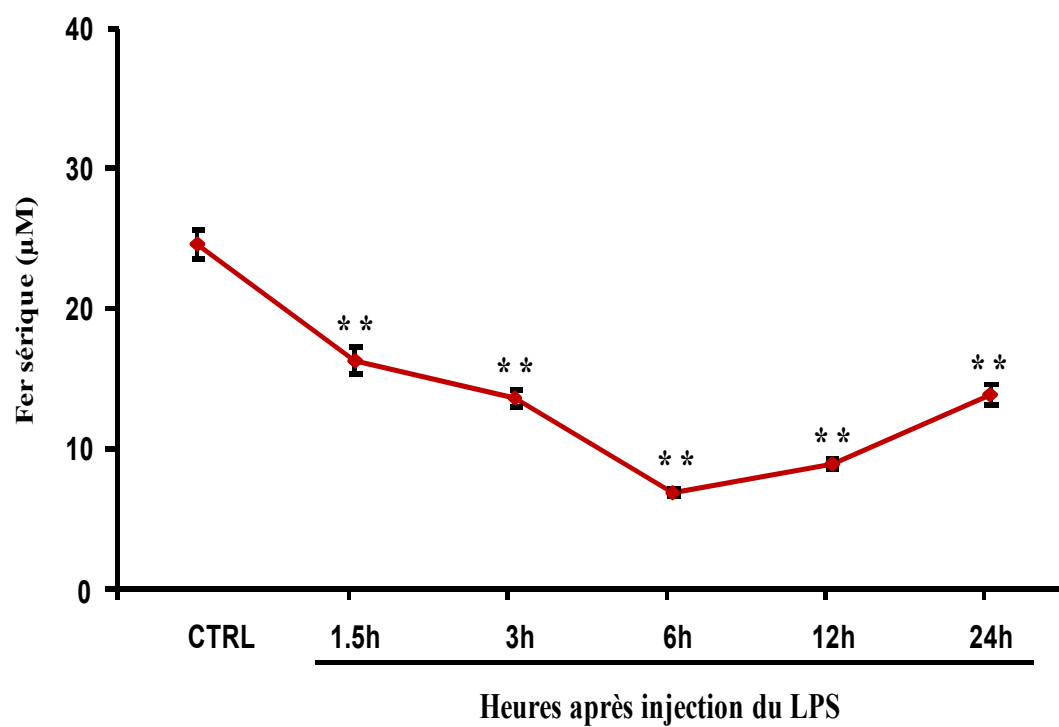


**Figure 30. Étude cinétique de l'expression de la ferroportine hépatique par qRT-PCR.** Après injection du LPS (CTRL, 1.5h, 3h, 6h, 12h, 24h), l'expression de la ferroportine hépatique a été évaluée en utilisant la qRT-PCR. (4 souris par groupe). \*\*p < 0.01.

**Figure 31. Étude cinétique de l'expression protéique de FPN1 hépatique par WB.**  
Après injection du LPS, l'expression protéique de la ferroportine hépatique des souris Wt a été évaluée par Western Blot (Représentative de 4 souris par groupe).

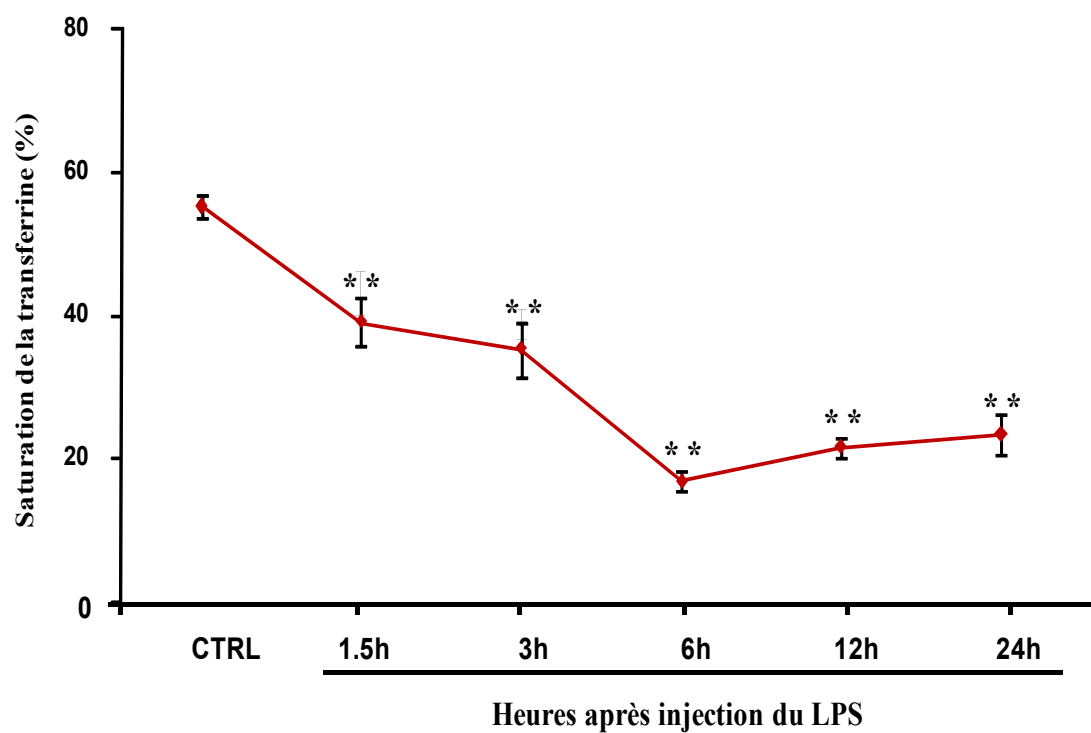
**Figure 32. Quantification de l'expression protéique de FPN1.**  
L'expression protéique de FPN1 hépatique des souris Wt a été quantifiée par densitométrie à partir du film de WB. (4 souris par groupe). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .





**Figure 33. Taux du fer sérique.**

Après injection du LPS aux souris C57BL/6, le taux du fer sérique a été évalué par une méthode colorimétrique avec le système Kodak Ektachem DT60. (4 souris par groupe). \*\* $p < 0.01$ .



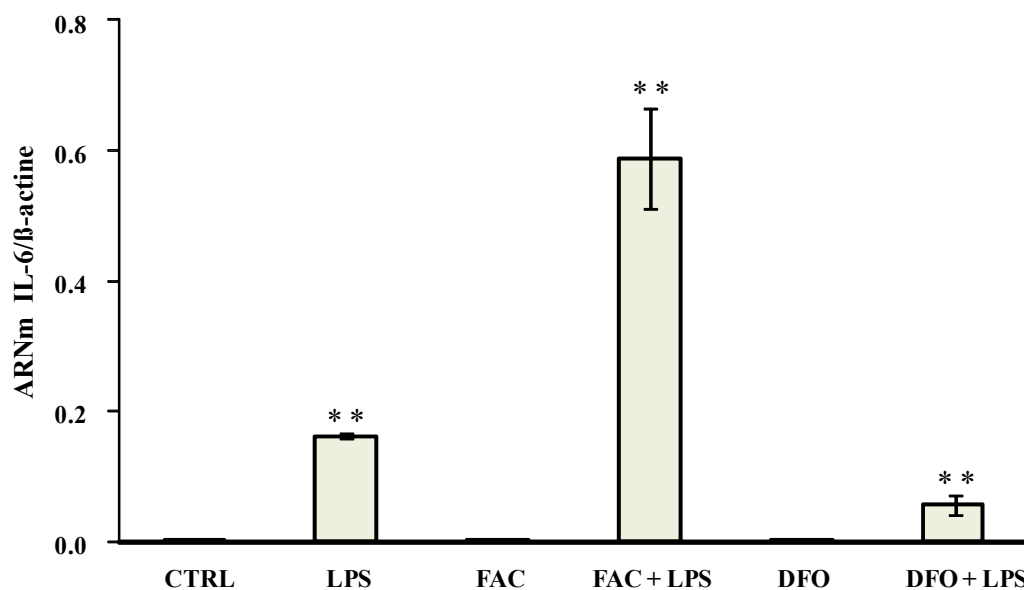
**Figure 34. Saturation de la transferrine.**

Après injection du LPS aux souris C57BL/6, la ST% a été évaluée par une méthode colorimétrique avec le système Kodak Ektachem DT60. (4 souris par groupe).

\*\*p < 0.01

- 8. Durant les infections, un taux élevé en fer renforce la production d'IL-6 par les macrophages.

Durant les infections, les macrophages activés sécrètent l'IL-6 qui se lie à son récepteur au niveau du foie et induit l'hépcidine hépatique [147]. Dû à ce rôle important d'IL-6, on voulait savoir si durant les infections, le taux du fer macrophagique peut moduler l'expression d'IL-6 macrophagique. Pour ce faire, les cellules RAW 264.7 ont été traitées avec un chélateur du fer, de la desferrioxamine (DFO), ou avec une source du fer, le citrate d'ammonium ferrique (FAC), pour être ensuite stimulées avec du LPS. Après traitement, l'ARN total extrait des cellules RAW 264.7 a été soumis à une qRT-PCR. L'analyse des résultats a montré que les macrophages non traités, ainsi que les macrophages traités avec du DFO ou avec du FAC, n'expriment pas l'IL-6, tandis que le LPS stimule l'expression d'IL-6 dans les macrophages et cette expression a été fortement renforcée par le FAC et réduite par le DFO. Ce résultat indique durant les infections le taux du fer dans les macrophages qui joue un rôle critique dans la régulation du taux de production d'IL-6 macrophagique (figure 35).



**Figure 35. Expression d'interleukine-6 dans les cellules RAW 264.7**

Après un traitement de 24h avec du DFO ou FAC et une stimulation de 4h avec du LPS, l'expression de l'IL-6 dans les macrophages RAW 264.7 a été évaluée en utilisant la qRT-PCR. \*\* $p < 0.01$ . (n=3).

## **V. DISCUSSION ET CONCLUSION**

## V. DISCUSSION ET CONCLUSION

Chez l'Homme, les états inflammatoires sont connus pour induire la chélation rapide du fer sérique en diminuant l'absorption intestinale du fer et son relargage par les macrophages. Lors des infections, l'hepcidine joue un rôle majeur dans le développement des hyposidérémies qui peuvent aboutir aux anémies inflammatoires dans le cas où le syndrome inflammatoire persiste [219]. *Hamp* est notamment régulé au niveau hépatique par le signal inflammatoire impliquant l'IL-6 [147]. D'autre part, des études ont montré que l'hepcidine est aussi exprimée au niveau des macrophages activés, durant les processus inflammatoires accompagnant les maladies infectieuses [132]. Pourtant, il y a très peu de données concernant la régulation de *HAMP* dans les macrophages.

Dans cette étude, nous avons exploré la régulation de *HAMP* macrophagique à travers les TLRs qui sont capables d'induire une réponse inflammatoire immédiate après la reconnaissance des PAMPs, constituant ainsi la première ligne de défense contre les infections microbiennes.

### ❖ Induction de l'hepcidine macrophagique par les ligands des TLRs :

Le traitement des macrophages RAW 264.7 avec divers ligands des TLRs, simule l'état inflammatoire rencontré durant les infections. Tant lorsqu'il est déjà démontré que l'induction de l'hepcidine dans les macrophages activés dépend du TLR4, son ligand, le LPS, a été utilisé comme contrôle positif. Après une stimulation de 24 heures, nos résultats ont montré que les ligands Pam3CSK4, FSL1, et LPS étaient capables d'induire l'hepcidine au niveau des macrophages RAW 264.7, contrairement au Poly(I:C). Pam3CSK4 est une lipoprotéine de la paroi des bactéries Gram<sup>+</sup> et Gram<sup>-</sup> reconnues par l'hétérodimère TLR2/1, et FSL étant une lipoprotéine synthétique dérivé des mycoplasmes reconnu par l'hétérodimère TLR2/6 [220, 221].

Ces données suggèrent que durant les infections par des microorganismes présentant ces composantes, l'expression de *HAMP* est induite dans les macrophages, et cette induction utilise probablement les hétérodimères TLR2/1 et TLR2/6, mais cela reste à confirmer comme les ligands Pam3CSK4 et FSL1 peuvent possiblement induire l'expression de l'hepcidine par activation des voies de signalisations autres que celles médiées par les TLRs. En outre, Poly(I:C) un ARNdb synthétique reconnu par TLR3 était incapable d'induire l'hepcidine dans les macrophages, mais cela n'élimine pas la possibilité que cette expression soit dose-dépendante [222].

D'autre part, l'étude cinétique effectuée avec du LPS a montré que ce dernier est capable non seulement d'induire l'expression de l'hepcidine macrophagique, mais aussi de réprimer l'expression de la ferroportine. Malgré qu'au niveau protéique la fonction de l'hepcidine dans la dégradation de la FPN1 est bien caractérisée, il n'est pas encore bien élucidé comment le LPS réduit le niveau d'ARN de la ferroportine [125, 126]. Il se peut que le LPS exercent un effet direct sur la FPN1 ou bien stimule la production de certaines protéines qui bloqueront la transcription du gène codant la ferroportine.

Comme les macrophages RAW 264.7 dérivent d'une lignée de cellules tumorales provenant du liquide d'ascite d'une souris présentant des tumeurs induites par injection intrapéritonéale d'Abselon leukemia virus, on voulait établir ces résultats dans les MPMs des souris sauvages C57BL/6 [223]. Dans cette série d'expériences, on a induit un état inflammatoire au niveau des MPMs en utilisant les ligands Pam3CSK4, FSL1, Poly(I:C) et LPS. Nos analyses ont montré des résultats similaires à ceux observés avec les cellules RAW 264.7. Cela confirme donc qu'au niveau des macrophages les ligands Pam3CSK4, FSL1 et LPS, à l'opposé de Poly(I:C), sont capables d'induire l'expression de *HAMP*. En revanche, on remarque que l'expression de *HAMP* dans les macrophages RAW 264.7 est 10 fois plus que celle observée dans les MPMs. Cela peut être dû au fait que les cellules RAW 264.7 sont des cellules tumorales, et il est bien connu que les cellules

tumorales sont incapables de contrôler le degré de leur expression génique, d'où une expression de *HAMP* plus élevée.

❖ Induction de l'hepcidine macrophagique à travers les TLRs :

Après avoir déterminé les ligands des TLRs capables d'induire l'expression de l'hepcidine dans les macrophages, nous voulions s'assurer que ces ligands sont en train d'activer cette expression à travers les TLRs et non par des voies de signalisations différentes. Pour ce faire, on a utilisé les MPMs *TLR2*<sup>-/-</sup>, puisque les ligands identifiés Pam3CSK4 et FSL1 correspondent respectivement à TLR2 associé avec TLR1 ou TLR6.

Dans cette série d'expériences, on a induit un état inflammatoire au niveau des MPMs sauvages et *TLR2*<sup>-/-</sup> en utilisant les ligands Pam3CSK4, FSL1. Après analyse, on a trouvé que l'expression de *HAMP* a été abolie dans les MPMs *TLR2*<sup>-/-</sup>, à l'inverse du contrôle positif les MPMs sauvages. Cela confirme la nécessité du TLR2 pour stimuler la voie de signalisation impliquée dans l'activation de *HAMP*. En plus, cela confirme les résultats dans d'autres études publiées : que les ligands des TLR1 et TLR6 ne peuvent pas activer la voie de signalisation indépendamment du TLR2, mais cette activation consiste à la coopération entre ces 2 récepteurs [224].

❖ La stimulation de l'hepcidine macrophagique à travers les TLRs utilise la voie MyD88 dépendante :

Après avoir confirmé la nécessité du TLR2 dans l'expression de l'hepcidine par Pam3CSK4 et FSL1, on voulait déterminer la voie de signalisation utilisée dans cette stimulation. Comme il y a deux voies majeures connues pour la signalisation des TLRs : une dépendante et l'autre indépendante de la protéine adaptatrice MyD88, on a étudié l'expression de l'hepcidine dans les MPMs *MyD88*<sup>-/-</sup> après stimulation avec les ligands Pam3CSK4, FSL1 et LPS [206].



Nos analyses ont montré que l'expression de *HAMP* a été abolie dans les MPMs *MyD88*<sup>-/-</sup>, à l'inverse des MPMs sauvages. Cela indique que la voie de signalisation utilisée pour induire *HAMP* dans les macrophages utilise celle de la protéine adaptatrice MyD88. D'un autre côté, les souris *MyD88*<sup>-/-</sup> présentent un défaut dans l'immunité antibactérienne dans une variété de maladies infectieuses, et c'est une lignée difficile à maintenir dû au haut risque d'infections [225]. Bien que c'est connu que la protéine MyD88 est essentielle pour activer divers gènes impliqués dans l'immunité innée et adaptative, nos résultats montrent que les souris *MyD88* sont incapables de produire l'hepcidine au niveau de leurs macrophages. Par conséquent, ces souris manquent l'activité antimicrobienne de l'hepcidine et probablement sont incapables de séquestrer le fer loin des microorganismes, ce qui les rend plus susceptibles aux infections, pourtant cela reste à confirmer dans des études postérieures.

- ❖ Les ligands des TLRs induisent l'expression de l'hepcidine hépatique et provoquent une hyposidérémie *in vivo* :

Après avoir déterminé les ligands des TLRs, la nécessité des TLRs et la voie de signalisation utilisée par ces derniers pour l'induction de *HAMP* dans les macrophages, on voulait étudier l'effet des PAMPs sur l'expression du l'hepcidine hépatique et l'effet de cette expression sur le taux du fer sérique.

Après 6 h d'injection des souris femelles C57BL/6 avec une dose unique de Pam3CSK4 100 µg/g ou FSL1 2 µg/g ou Poly I: C 5 µg/g et/ou LPS 1 µg/g, nos analyses ont montré que Pam3CSK4 et LPS induisaient d'une façon significative l'expression de l'hepcidine hépatique, à l'inverse de FSL1 et Poly (I:C). En outre, cette expression est 1000 fois plus que celle observée dans les macrophages, ce qui détermine l'importance liée au fonctionnement et à la régulation du *HAMP* hépatique par rapport au *HAMP* macrophagique.

Par ailleurs, ce qui semble très intéressant c'est que FSL1 et Poly(I:C) malgré leur inaptitude d'induire l'hepcidine hépatique, étaient capables de provoquer une hyposidérémie significative similaire à celle observée dans les souris injectées avec Pam3CSK4 et LPS. Cela indique que l'hyposidérémie observée chez les souris injectées avec FSL1 et Poly (I:C) survient indépendamment de l'hepcidine, ce qui nous tient à chercher un nouveau mécanisme, outre que *HAMP*, capable de diminuer le taux du fer sérique ainsi que la TS%. Similairement aux études *in vitro*, l'étude cinétique effectuée *in vivo* avec du LPS a montré que ce dernier était capable non seulement d'induire l'expression de l'hepcidine hépatique mais aussi de réprimer l'expression de la ferroportine hépatique au niveau transcriptionnel et protéique. En plus, cela a été accompagné d'un taux élevé d'IL-6 et du TNF-alpha qui jouent respectivement un rôle critique dans l'induction de *HAMP* hépatique et du développement des hyposidérémies [176].

- ❖ Un taux élevé en fer renforce la production d'IL-6 par les macrophages durant les infections :

Durant les infections, les macrophages activés sécrètent l'IL-6 qui se lie à son récepteur au niveau du foie et induit l'hepcidine hépatique [147]. Par ailleurs, des études ont montré que la quantité du fer dans les macrophages peut moduler l'expression du facteur de transcription NF-κB impliqué dans l'activation des gènes codant des cytokines inflammatoires [226]. D'autre part, nos résultats ont montré que le taux du fer macrophagique peut aussi moduler l'expression d'IL-6 durant les états inflammatoires. En fait, durant la stimulation des macrophages avec du LPS, la production d'IL-6 était renforcée par la présence d'une concentration élevée en fer dans les macrophages et par contre réduite en absence du fer. Ces résultats indiquent que durant les infections, le taux du fer macrophagique stimulera en plus l'expression d'IL-6 ce qui entraînera une expression d'hepcidine plus élevée nécessaire à la dégradation de la ferroportine et à la privation du fer des microbes.

En conclusion, ces observations indiquent que l'expression de l'hepcidine dans les macrophages peut être régulée par différents TLRs, ce qui suggère que la production d'hepcidine macrophagique fait partie de la réponse immunitaire médiée par la voie MyD88 des TLR2/1, TLR2/6 et TLR4 activés. En revanche, le développement d'une hyposidérémie chez les souris n'exprimant pas l'hepcidine hépatique indique que *HAMP* n'est pas le seul candidat jouant le rôle hyposidérémiant durant l'inflammation.

## **VI. PERSPECTIVES**

## VI. PERSPECTIVES

Dans cette étude, nous avons montré que durant les infections les PAMPs : Pam3CSK4, FSL1 et LPS se lient respectivement au TLR2/1, TLR2/6 et TLR4, ce qui active la voie MyD88 dépendante, entraînant ainsi l'expression d'hepcidine au niveau des macrophages. Par contre, Poly(I:C) était incapable de stimuler l'expression de l'hepcidine macrophagique à travers TLR3.

Auparavant, des études effectuées dans notre laboratoire ont montré que l'induction de l'hepcidine dans le foie par LPS dépend de la voie de signalisation médiée par TLR4 [176].

Dans cette étude nous avons montré que Pam3CSK4 était capable de stimuler l'expression de l'hepcidine hépatique et de provoquer une hyposidérémie chez les souris sauvages C57BL/6, ce qui suggère que d'autres TLRs que le TLR4 peuvent être aussi impliqués.

Malgré que Poly(I:C) et FSL1 n'étaient pas capables d'induire l'expression hépatique, ils étaient aussi compétentes de provoquer une hyposidérémie significative chez les souris C57BL/6. Pour cela, il semble que les voies de signalisations des TLRs peuvent activer un mécanisme indépendant de l'hepcidine capable de diminuer le taux du fer sérique.

Ainsi, ces résultats nous poussent à suivre de nouvelles recherches basées sur l'étude des mécanismes de ces réponses.

Il sera intéressant :

- D'étudier le stockage du fer après la stimulation des TLRs avec des ligands sélectionnés, ce qui nous informera sur la capacité des macrophages à séquestrer le fer durant les infections et les inflammations. La teneur en fer macrophagique sera mesurée par cytométrie de flux en utilisant la calcéine qui est un marqueur sensible au fer.

- D'étudier le flux du fer après activation des TLRs, et cela en étudiant par qRT-PCR et Western-Blot l'expression des protéines impliquées dans l'homéostasie du fer, telles que TfR, FPN1, DMT1, NRAMP1. En fait, cela nous permettra de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans le retrait du fer de la circulation et sa séquestration dans les macrophages.
- D'étudier *in vivo* comment les voies de signalisation des TLRs seront impliquées dans la régulation des taux du fer sérique et le développement des hyposidérémies. En utilisant des souris « knock-out », soit MyD88<sup>-/-</sup> pour la voie MyD88 dépendante et TICAM<sup>-/-</sup> pour la voie MyD88 indépendante et les doubles « knock-out » MyD88TICAM<sup>-/-</sup> pour les 2 voies, il est sera possible d'élucider comment durant les infections, l'activation de ces voies de signalisation sera impliquée dans la régulation des gènes du métabolisme du fer, notamment l'expression de l'hepcidine, ainsi que le développement des hyposidérémies.

Finalement, en raison de la similitude remarquable du métabolisme du fer chez les mammifères, ces études contribueront à élucider des aspects importants de la biologie du fer, qui sont pertinents à la physiologie humaine et animale.

## VII REFERENCES

1. Aisen, P., C. Enns, and M. Wessling-Resnick, *Chemistry and biology of eukaryotic iron metabolism*. Int J Biochem Cell Biol, 2001. 33(10): p. 940-59.
2. Papanikolaou, G. and K. Pantopoulos, *Iron metabolism and toxicity*. Toxicol Appl Pharmacol, 2005. 202(2): p. 199-211.
3. Ryter, S.W. and R.M. Tyrrell, *The heme synthesis and degradation pathways: role in oxidant sensitivity. Heme oxygenase has both pro- and antioxidant properties*. Free Radic Biol Med, 2000. 28(2): p. 289-309.
4. Tsiftoglou, A.S., A.I. Tsamadou, and L.C. Papadopoulou, *Heme as key regulator of major mammalian cellular functions: molecular, cellular, and pharmacological aspects*. Pharmacol Ther, 2006. 111(2): p. 327-45.
5. Ponka, P., *Cell biology of heme*. Am J Med Sci, 1999. 318(4): p. 241-56.
6. Galaris, D. and K. Pantopoulos, *Oxidative stress and iron homeostasis: mechanistic and health aspects*. Crit Rev Clin Lab Sci, 2008. 45(1): p. 1-23.
7. Brzoska, K., S. Meczynska, and M. Kruszewski, *Iron-sulfur cluster proteins: electron transfer and beyond*. Acta Biochim Pol, 2006. 53(4): p. 685-91.
8. Bandyopadhyay, S., K. Chandramouli, and M.K. Johnson, *Iron-sulfur cluster biosynthesis*. Biochem Soc Trans, 2008. 36(Pt 6): p. 1112-9.
9. Vinella, D., et al., *Iron-sulfur (Fe/S) protein biogenesis: phylogenomic and genetic studies of A-type carriers*. PLoS Genet, 2009. 5(5): p. e1000497.
10. Johnson, D.C., et al., *Structure, function, and formation of biological iron-sulfur clusters*. Annu Rev Biochem, 2005. 74: p. 247-81.
11. Schneider, C., et al., *Control of oxygenation in lipoxygenase and cyclooxygenase catalysis*. Chem Biol, 2007. 14(5): p. 473-88.
12. Andreou, A.Z., et al., *On the substrate binding of linoleate 9-lipoxygenases*. Lipids, 2009. 44(3): p. 207-15.
13. Mosblech, A., I. Feussner, and I. Heilmann, *Oxylipins: structurally diverse metabolites from fatty acid oxidation*. Plant Physiol Biochem, 2009. 47(6): p. 511-7.
14. Tsitsigiannis, D.I. and N.P. Keller, *Oxylipins as developmental and host-fungal communication signals*. Trends Microbiol, 2007. 15(3): p. 109-18.
15. Sigal, E., C.W. Laughton, and M.A. Mulkins, *Oxidation, lipoxygenase, and atherogenesis*. Ann N Y Acad Sci, 1994. 714: p. 211-24.
16. Andreou, A., F. Brodhun, and I. Feussner, *Biosynthesis of oxylipins in non-mammals*. Prog Lipid Res, 2009. 48(3-4): p. 148-70.
17. Pierce, A., D. Legrand, and J. Mazurier, *[Lactoferrin: a multifunctional protein]*. Med Sci (Paris), 2009. 25(4): p. 361-9.
18. Torrents, E., et al., *Ribonucleotide reductases: divergent evolution of an ancient enzyme*. J Mol Evol, 2002. 55(2): p. 138-52.
19. Herrick, J. and B. Sclavi, *Ribonucleotide reductase and the regulation of DNA replication: an old story and an ancient heritage*. Mol Microbiol, 2007. 63(1): p. 22-34.

20. Li, H. and Z.M. Qian, *Transferrin/transferrin receptor-mediated drug delivery*. Med Res Rev, 2002. 22(3): p. 225-50.
21. Kohgo, Y., et al., *Body iron metabolism and pathophysiology of iron overload*. Int J Hematol, 2008. 88(1): p. 7-15.
22. Koorts, A.M. and M. Viljoen, *Ferritin and ferritin isoforms I: Structure-function relationships, synthesis, degradation and secretion*. Arch Physiol Biochem, 2007. 113(1): p. 30-54.
23. Ponka, P., C. Beaumont, and D.R. Richardson, *Function and regulation of transferrin and ferritin*. Semin Hematol, 1998. 35(1): p. 35-54.
24. McClelland, A., L.C. Kuhn, and F.H. Ruddle, *The human transferrin receptor gene: genomic organization, and the complete primary structure of the receptor deduced from a cDNA sequence*. Cell, 1984. 39(2 Pt 1): p. 267-74.
25. Schneider, C., et al., *Primary structure of human transferrin receptor deduced from the mRNA sequence*. Nature, 1984. 311(5987): p. 675-8.
26. Ponka, P. and C.N. Lok, *The transferrin receptor: role in health and disease*. Int J Biochem Cell Biol, 1999. 31(10): p. 1111-37.
27. Williams, A.M. and C.A. Enns, *A mutated transferrin receptor lacking asparagine-linked glycosylation sites shows reduced functionality and an association with binding immunoglobulin protein*. J Biol Chem, 1991. 266(26): p. 17648-54.
28. Zerial, M., et al., *The transmembrane segment of the human transferrin receptor functions as a signal peptide*. EMBO J, 1986. 5(7): p. 1543-50.
29. Zerial, M., D. Huylebroeck, and H. Garoff, *Foreign transmembrane peptides replacing the internal signal sequence of transferrin receptor allow its translocation and membrane binding*. Cell, 1987. 48(1): p. 147-55.
30. Young, S.P., A. Bomford, and R. Williams, *The effect of the iron saturation of transferrin on its binding and uptake by rabbit reticulocytes*. Biochem J, 1984. 219(2): p. 505-10.
31. Trinder, D. and E. Baker, *Transferrin receptor 2: a new molecule in iron metabolism*. Int J Biochem Cell Biol, 2003. 35(3): p. 292-6.
32. Levy, J.E., et al., *Transferrin receptor is necessary for development of erythrocytes and the nervous system*. Nat Genet, 1999. 21(4): p. 396-9.
33. Beutler, E., *Commentary: mutations of transferrin receptor 2 (Trf-2) and iron storage disease*. Blood Cells Mol Dis, 2001. 27(1): p. 294-5.
34. Andrews, N.C., *Disorders of iron metabolism*. N Engl J Med, 1999. 341(26): p. 1986-95.
35. Aisen, P., *Transferrin receptor 1*. Int J Biochem Cell Biol, 2004. 36(11): p. 2137-43.
36. Cheng, Y., et al., *Structure of the human transferrin receptor-transferrin complex*. Cell, 2004. 116(4): p. 565-76.
37. Bali, P.K., O. Zak, and P. Aisen, *A new role for the transferrin receptor in the release of iron from transferrin*. Biochemistry, 1991. 30(2): p. 324-8.
38. Sipe, D.M. and R.F. Murphy, *Binding to cellular receptors results in increased iron release from transferrin at mildly acidic pH*. J Biol Chem, 1991. 266(13): p. 8002-7.



39. Ohgami, R.S., et al., *Identification of a ferrereductase required for efficient transferrin-dependent iron uptake in erythroid cells*. Nat Genet, 2005. 37(11): p. 1264-9.
40. Ohgami, R.S., et al., *The Steap proteins are metalloredutases*. Blood, 2006. 108(4): p. 1388-94.
41. Roy, C.N. and C.A. Enns, *Iron homeostasis: new tales from the crypt*. Blood, 2000. 96(13): p. 4020-7.
42. Baynes, R.D., Y.J. Shih, and J.D. Cook, *Mechanism of production of the serum transferrin receptor*. Adv Exp Med Biol, 1994. 356: p. 61-8.
43. Anderson, G.J. and C.D. Vulpe, *Mammalian iron transport*. Cell Mol Life Sci, 2009. 66(20): p. 3241-61.
44. Breuer, W., C. Hershko, and Z.I. Cabantchik, *The importance of non-transferrin bound iron in disorders of iron metabolism*. Transfus Sci, 2000. 23(3): p. 185-92.
45. Esposito, B.P., et al., *Labile plasma iron in iron overload: redox activity and susceptibility to chelation*. Blood, 2003. 102(7): p. 2670-7.
46. Hider, R.C., *Nature of nontransferrin-bound iron*. Eur J Clin Invest, 2002. 32 Suppl 1: p. 50-4.
47. Aisen, P., A. Leibman, and J. Zweier, *Stoichiometric and site characteristics of the binding of iron to human transferrin*. J Biol Chem, 1978. 253(6): p. 1930-7.
48. Hamill, R.L., J.C. Woods, and B.A. Cook, *Congenital atransferrinemia. A case report and review of the literature*. Am J Clin Pathol, 1991. 96(2): p. 215-8.
49. Simpson, R.J., et al., *Non-transferrin-bound iron species in the serum of hypotransferrinaemic mice*. Biochim Biophys Acta, 1992. 1156(1): p. 19-26.
50. Hayashi, A., et al., *Studies on familial hypotransferrinemia: unique clinical course and molecular pathology*. Am J Hum Genet, 1993. 53(1): p. 201-13.
51. Bernstein, S.E., *Hereditary hypotransferrinemia with hemosiderosis, a murine disorder resembling human atransferrinemia*. J Lab Clin Med, 1987. 110(6): p. 690-705.
52. Gelvan, D., et al., *Ferritin uptake by human erythroid precursors is a regulated iron uptake pathway*. Blood, 1996. 88(8): p. 3200-7.
53. Gunshin, H., et al., *Slc11a2 is required for intestinal iron absorption and erythropoiesis but dispensable in placenta and liver*. J Clin Invest, 2005. 115(5): p. 1258-66.
54. Ganz, T., *Molecular control of iron transport*. J Am Soc Nephrol, 2007. 18(2): p. 394-400.
55. Huang, H., S. Akira, and M.M. Santos, *Is the iron donor lipocalin 2 implicated in the pathophysiology of hereditary hemochromatosis?* Hepatology, 2009. 49(3): p. 1012-6.
56. Oudit, G.Y., et al., *L-type Ca<sup>2+</sup> channels provide a major pathway for iron entry into cardiomyocytes in iron-overload cardiomyopathy*. Nat Med, 2003. 9(9): p. 1187-94.
57. Gutierrez, J.A., et al., *Functional expression cloning and characterization of SFT, a stimulator of Fe transport*. J Cell Biol, 1997. 139(4): p. 895-905.
58. Gehrke, S.G., et al., *Ubch5A, a member of human E2 ubiquitin-conjugating enzymes, is closely related to SFT, a stimulator of iron transport, and is up-regulated in hereditary hemochromatosis*. Blood, 2003. 101(8): p. 3288-93.

59. Liuzzi, J.P., et al., *Zip14 (Slc39a14) mediates non-transferrin-bound iron uptake into cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. 103(37): p. 13612-7.
60. Edison, E.S., A. Bajel, and M. Chandy, *Iron homeostasis: new players, newer insights*. Eur J Haematol, 2008. 81(6): p. 411-24.
61. Comporti, M., *Introduction-serial review: iron and cellular redox status*. Free Radic Biol Med, 2002. 32(7): p. 565-7.
62. Le, N.T. and D.R. Richardson, *Potent iron chelators increase the mRNA levels of the universal cyclin-dependent kinase inhibitor p21(CIP1/WAF1), but paradoxically inhibit its translation: a potential mechanism of cell cycle dysregulation*. Carcinogenesis, 2003. 24(6): p. 1045-58.
63. Abboud, S. and D.J. Haile, *A novel mammalian iron-regulated protein involved in intracellular iron metabolism*. J Biol Chem, 2000. 275(26): p. 19906-12.
64. Donovan, A., et al., *Positional cloning of zebrafish ferroportin1 identifies a conserved vertebrate iron exporter*. Nature, 2000. 403(6771): p. 776-81.
65. Frazer, D.M., et al., *Delayed hepcidin response explains the lag period in iron absorption following a stimulus to increase erythropoiesis*. Gut, 2004. 53(10): p. 1509-15.
66. Donovan, A., et al., *The iron exporter ferroportin/Slc40a1 is essential for iron homeostasis*. Cell Metab, 2005. 1(3): p. 191-200.
67. Rouault, T.A., *The role of iron regulatory proteins in mammalian iron homeostasis and disease*. Nat Chem Biol, 2006. 2(8): p. 406-14.
68. Haile, D.J., et al., *Cellular regulation of the iron-responsive element binding protein: disassembly of the cubane iron-sulfur cluster results in high-affinity RNA binding*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. 89(24): p. 11735-9.
69. Ke, Y., et al., *Loops and bulge/loops in iron-responsive element isoforms influence iron regulatory protein binding. Fine-tuning of mRNA regulation?* J Biol Chem, 1998. 273(37): p. 23637-40.
70. Hentze, M.W., M.U. Muckenthaler, and N.C. Andrews, *Balancing acts: molecular control of mammalian iron metabolism*. Cell, 2004. 117(3): p. 285-97.
71. Leipunienė, R. and E.C. Theil, *The family of iron responsive RNA structures regulated by changes in cellular iron and oxygen*. Cell Mol Life Sci, 2007. 64(22): p. 2945-55.
72. Pantopoulos, K., *Iron metabolism and the IRE/IRP regulatory system: an update*. Ann N Y Acad Sci, 2004. 1012: p. 1-13.
73. Wang, J., et al., *Insights on regulation and function of the iron regulatory protein 1 (IRP1)*. Hemoglobin, 2008. 32(1-2): p. 109-15.
74. Hentze, M.W. and L.C. Kuhn, *Molecular control of vertebrate iron metabolism: mRNA-based regulatory circuits operated by iron, nitric oxide, and oxidative stress*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. 93(16): p. 8175-82.
75. Eisenstein, R.S. and K.P. Blemings, *Iron regulatory proteins, iron responsive elements and iron homeostasis*. J Nutr, 1998. 128(12): p. 2295-8.
76. Yamanaka, K., et al., *Identification of the ubiquitin-protein ligase that recognizes oxidized IRP2*. Nat Cell Biol, 2003. 5(4): p. 336-40.
77. Muckenthaler, M.U., B. Galy, and M.W. Hentze, *Systemic iron homeostasis and the iron-responsive element/iron-regulatory protein (IRE/IRP) regulatory network*. Annu Rev Nutr, 2008. 28: p. 197-213.

78. Cadet, E., et al., [*Advances in iron metabolism: a transition state*]. Rev Med Interne, 2005. 26(4): p. 315-24.
79. Brittenham, G.M., *New advances in iron metabolism, iron deficiency, and iron overload*. Curr Opin Hematol, 1994. 1(2): p. 101-6.
80. Knutson, M. and M. Wessling-Resnick, *Iron metabolism in the reticuloendothelial system*. Crit Rev Biochem Mol Biol, 2003. 38(1): p. 61-88.
81. Weiss, G. and L.T. Goodnough, *Anemia of chronic disease*. N Engl J Med, 2005. 352(10): p. 1011-23.
82. Jabado, N., et al., *Iron transporter Nramp2/DMT-1 is associated with the membrane of phagosomes in macrophages and Sertoli cells*. Blood, 2002. 100(7): p. 2617-22.
83. Beaumont, C. and F. Canonne-Hergaux, [*Erythrophagocytosis and recycling of heme iron in normal and pathological conditions; regulation by hepcidin*]. Transfus Clin Biol, 2005. 12(2): p. 123-30.
84. Graversen, J.H., M. Madsen, and S.K. Moestrup, *CD163: a signal receptor scavenging haptoglobin-hemoglobin complexes from plasma*. Int J Biochem Cell Biol, 2002. 34(4): p. 309-14.
85. Levine, D.S. and J.W. Woods, *Immunolocalization of transferrin and transferrin receptor in mouse small intestinal absorptive cells*. J Histochem Cytochem, 1990. 38(6): p. 851-8.
86. Parmley, R.T., J.C. Barton, and M.E. Conrad, *Ultrastructural localization of transferrin, transferrin receptor, and iron-binding sites on human placental and duodenal microvilli*. Br J Haematol, 1985. 60(1): p. 81-9.
87. Chua, A.C., et al., *The regulation of cellular iron metabolism*. Crit Rev Clin Lab Sci, 2007. 44(5-6): p. 413-59.
88. McKie, A.T., et al., *An iron-regulated ferric reductase associated with the absorption of dietary iron*. Science, 2001. 291(5509): p. 1755-9.
89. Gunshin, H., et al., *Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter*. Nature, 1997. 388(6641): p. 482-8.
90. Shayeghi, M., et al., *Identification of an intestinal heme transporter*. Cell, 2005. 122(5): p. 789-801.
91. Conrad, M.E. and J.N. Umbreit, *Pathways of iron absorption*. Blood Cells Mol Dis, 2002. 29(3): p. 336-55.
92. Cantrill, S. and R.J. Walsh, *Iron absorption from the gastro-intestinal tract. A reassessment of the "mucosal block" theory and the influence of the rate of erythropoiesis*. Aust J Exp Biol Med Sci, 1962. 40: p. 17-23.
93. Finch, C., *Regulators of iron balance in humans*. Blood, 1994. 84(6): p. 1697-702.
94. Weiss, G., *Pathogenesis and treatment of anaemia of chronic disease*. Blood Rev, 2002. 16(2): p. 87-96.
95. Makui, H., et al., *Contribution of Hfe expression in macrophages to the regulation of hepatic hepcidin levels and iron loading*. Blood, 2005. 106(6): p. 2189-95.
96. Ganz, T., *Hepcidin, a key regulator of iron metabolism and mediator of anemia of inflammation*. Blood, 2003. 102(3): p. 783-8.
97. Viatte, L. and S. Vaulont, *Hepcidin, the iron watcher*. Biochimie, 2009. 91(10): p. 1223-8.

98. Verga Falzacappa, M.V. and M.U. Muckenthaler, *Hepcidin: iron-hormone and anti-microbial peptide*. Gene, 2005. 364: p. 37-44.
99. Cardarelli, G. and G.M. Anatra, [*Hepcidin: a key peptide in iron metabolism*]. Minerva Med, 2003. 94(3): p. 135-9.
100. Park, C.H., et al., *Hepcidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver*. J Biol Chem, 2001. 276(11): p. 7806-10.
101. Roetto, A., et al., *Mutant antimicrobial peptide hepcidin is associated with severe juvenile hemochromatosis*. Nat Genet, 2003. 33(1): p. 21-2.
102. Krause, A., et al., *LEAP-1, a novel highly disulfide-bonded human peptide, exhibits antimicrobial activity*. FEBS Lett, 2000. 480(2-3): p. 147-50.
103. Nemeth, E. and T. Ganz, *Regulation of iron metabolism by hepcidin*. Annu Rev Nutr, 2006. 26: p. 323-42.
104. Shi, J. and A.C. Camus, *Hepcidins in amphibians and fishes: Antimicrobial peptides or iron-regulatory hormones?* Dev Comp Immunol, 2006. 30(9): p. 746-55.
105. Pigeon, C., et al., *A new mouse liver-specific gene, encoding a protein homologous to human antimicrobial peptide hepcidin, is overexpressed during iron overload*. J Biol Chem, 2001. 276(11): p. 7811-9.
106. Lou, D.Q., et al., *Functional differences between hepcidin 1 and 2 in transgenic mice*. Blood, 2004. 103(7): p. 2816-21.
107. Gagliardo, B., et al., *Production of biologically active forms of recombinant hepcidin, the iron-regulatory hormone*. FEBS J, 2008. 275(15): p. 3793-803.
108. Valore, E.V. and T. Ganz, *Posttranslational processing of hepcidin in human hepatocytes is mediated by the prohormone convertase furin*. Blood Cells Mol Dis, 2008. 40(1): p. 132-8.
109. Kartikasari, A.E., et al., *Secretion of bioactive hepcidin-25 by liver cells correlates with its gene transcription and points towards synergism between iron and inflammation signaling pathways*. Biochim Biophys Acta, 2008. 1784(12): p. 2029-37.
110. Nemeth, E., et al., *The N-terminus of hepcidin is essential for its interaction with ferroportin: structure-function study*. Blood, 2006. 107(1): p. 328-33.
111. Hunter, H.N., et al., *The solution structure of human hepcidin, a peptide hormone with antimicrobial activity that is involved in iron uptake and hereditary hemochromatosis*. J Biol Chem, 2002. 277(40): p. 37597-603.
112. Zhang, A.S., et al., *Localization of iron metabolism-related mRNAs in rat liver indicate that HFE is expressed predominantly in hepatocytes*. Blood, 2004. 103(4): p. 1509-14.
113. Kulaksiz, H., et al., *The iron-regulatory peptide hormone hepcidin: expression and cellular localization in the mammalian kidney*. J Endocrinol, 2005. 184(2): p. 361-70.
114. Liu, X.B., et al., *Regulation of hepcidin and ferroportin expression by lipopolysaccharide in splenic macrophages*. Blood Cells Mol Dis, 2005. 35(1): p. 47-56.
115. Peyssonnaud, C., et al., *TLR4-dependent hepcidin expression by myeloid cells in response to bacterial pathogens*. Blood, 2006. 107(9): p. 3727-32.

116. Nguyen, N.B., et al., *Hepcidin expression and iron transport in alveolar macrophages*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2006. 291(3): p. L417-25.
117. Bekri, S., et al., *Increased adipose tissue expression of hepcidin in severe obesity is independent from diabetes and NASH*. Gastroenterology, 2006. 131(3): p. 788-96.
118. Ganz, T., *Hepcidin--a regulator of intestinal iron absorption and iron recycling by macrophages*. Best Pract Res Clin Haematol, 2005. 18(2): p. 171-82.
119. Nicolas, G., et al., *Lack of hepcidin gene expression and severe tissue iron overload in upstream stimulatory factor 2 (USF2) knockout mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. 98(15): p. 8780-5.
120. Nicolas, G., et al., *Severe iron deficiency anemia in transgenic mice expressing liver hepcidin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. 99(7): p. 4596-601.
121. Rivera, S., et al., *Hepcidin excess induces the sequestration of iron and exacerbates tumor-associated anemia*. Blood, 2005. 105(4): p. 1797-802.
122. Roetto, A. and C. Camaschella, *New insights into iron homeostasis through the study of non-HFE hereditary haemochromatosis*. Best Pract Res Clin Haematol, 2005. 18(2): p. 235-50.
123. Weinberg, E.D. and J. Miklossy, *Iron withholding: a defense against disease*. J Alzheimers Dis, 2008. 13(4): p. 451-63.
124. Rivera, S., et al., *Synthetic hepcidin causes rapid dose-dependent hypoferremia and is concentrated in ferroportin-containing organs*. Blood, 2005. 106(6): p. 2196-9.
125. Delaby, C., et al., *Presence of the iron exporter ferroportin at the plasma membrane of macrophages is enhanced by iron loading and down-regulated by hepcidin*. Blood, 2005. 106(12): p. 3979-84.
126. Nemeth, E., et al., *Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization*. Science, 2004. 306(5704): p. 2090-3.
127. Knutson, M.D., et al., *Iron release from macrophages after erythrophagocytosis is up-regulated by ferroportin 1 overexpression and down-regulated by hepcidin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. 102(5): p. 1324-8.
128. Delaby, C., et al., *A physiological model to study iron recycling in macrophages*. Exp Cell Res, 2005. 310(1): p. 43-53.
129. De Domenico, I., et al., *The molecular mechanism of hepcidin-mediated ferroportin down-regulation*. Mol Biol Cell, 2007. 18(7): p. 2569-78.
130. Collins, J.F., M. Wessling-Resnick, and M.D. Knutson, *Hepcidin regulation of iron transport*. J Nutr, 2008. 138(11): p. 2284-8.
131. Frazer, D.M. and G.J. Anderson, *The orchestration of body iron intake: how and where do enterocytes receive their cues?* Blood Cells Mol Dis, 2003. 30(3): p. 288-97.
132. Vyoral, D. and J. Petrak, *Hepcidin: a direct link between iron metabolism and immunity*. Int J Biochem Cell Biol, 2005. 37(9): p. 1768-73.
133. Feder, J.N., et al., *A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis*. Nat Genet, 1996. 13(4): p. 399-408.
134. Robb, A. and M. Wessling-Resnick, *Regulation of transferrin receptor 2 protein levels by transferrin*. Blood, 2004. 104(13): p. 4294-9.

135. Johnson, M.B. and C.A. Enns, *Diferric transferrin regulates transferrin receptor 2 protein stability*. Blood, 2004. 104(13): p. 4287-93.
136. Ramey, G., J.C. Deschemin, and S. Vaulont, *Cross-talk between the mitogen activated protein kinase and bone morphogenetic protein/hemojuvelin pathways is required for the induction of hepcidin by holotransferrin in primary mouse hepatocytes*. Haematologica, 2009. 94(6): p. 765-72.
137. Gao, J., et al., *Interaction of the hereditary hemochromatosis protein HFE with transferrin receptor 2 is required for transferrin-induced hepcidin expression*. Cell Metab, 2009. 9(3): p. 217-27.
138. Schmidt, P.J., et al., *The transferrin receptor modulates Hfe-dependent regulation of hepcidin expression*. Cell Metab, 2008. 7(3): p. 205-14.
139. Papanikolaou, G., et al., *Mutations in HFE2 cause iron overload in chromosome 1q-linked juvenile hemochromatosis*. Nat Genet, 2004. 36(1): p. 77-82.
140. Babitt, J.L., et al., *Bone morphogenetic protein signaling by hemojuvelin regulates hepcidin expression*. Nat Genet, 2006. 38(5): p. 531-9.
141. Lin, L., Y.P. Goldberg, and T. Ganz, *Competitive regulation of hepcidin mRNA by soluble and cell-associated hemojuvelin*. Blood, 2005. 106(8): p. 2884-9.
142. Kemna, E., et al., *Time-course analysis of hepcidin, serum iron, and plasma cytokine levels in humans injected with LPS*. Blood, 2005. 106(5): p. 1864-6.
143. Nemeth, E., et al., *IL-6 mediates hypoferremia of inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone hepcidin*. J Clin Invest, 2004. 113(9): p. 1271-6.
144. Jurado, R.L., *Iron, infections, and anemia of inflammation*. Clin Infect Dis, 1997. 25(4): p. 888-95.
145. Nemeth, E., et al., *Hepcidin, a putative mediator of anemia of inflammation, is a type II acute-phase protein*. Blood, 2003. 101(7): p. 2461-3.
146. Lee, P., et al., *Regulation of hepcidin transcription by interleukin-1 and interleukin-6*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. 102(6): p. 1906-10.
147. Wrighting, D.M. and N.C. Andrews, *Interleukin-6 induces hepcidin expression through STAT3*. Blood, 2006. 108(9): p. 3204-9.
148. Verga Falzacappa, M.V., et al., *A bone morphogenetic protein (BMP)-responsive element in the hepcidin promoter controls HFE2-mediated hepatic hepcidin expression and its response to IL-6 in cultured cells*. J Mol Med, 2008. 86(5): p. 531-40.
149. Nicolas, G., et al., *The gene encoding the iron regulatory peptide hepcidin is regulated by anemia, hypoxia, and inflammation*. J Clin Invest, 2002. 110(7): p. 1037-44.
150. Lakhai, S., et al., *Regulation of growth differentiation factor 15 expression by intracellular iron*. Blood, 2009. 113(7): p. 1555-63.
151. Nicolas, G., et al., *Hepcidin, a new iron regulatory peptide*. Blood Cells Mol Dis, 2002. 29(3): p. 327-35.
152. Huang, H., et al., *Contribution of STAT3 and SMAD4 pathways to the regulation of hepcidin by opposing stimuli*. Blood, 2009. 113(15): p. 3593-9.
153. Peyssonnaud, C., et al., *Regulation of iron homeostasis by the hypoxia-inducible transcription factors (HIFs)*. J Clin Invest, 2007. 117(7): p. 1926-32.
154. Pietrangelo, A., *Non-HFE hemochromatosis*. Hepatology, 2004. 39(1): p. 21-9.

155. Muckenthaler, M., et al., *Regulatory defects in liver and intestine implicate abnormal hepcidin and Cybrd1 expression in mouse hemochromatosis*. Nat Genet, 2003. 34(1): p. 102-7.
156. Pietrangelo, A., *Hereditary hemochromatosis*. Annu Rev Nutr, 2006. 26: p. 251-70.
157. Corwin, H.L., et al., *The CRIT Study: Anemia and blood transfusion in the critically ill--current clinical practice in the United States*. Crit Care Med, 2004. 32(1): p. 39-52.
158. Kemna, E., et al., *Novel urine hepcidin assay by mass spectrometry*. Blood, 2005. 106(9): p. 3268-70.
159. Neckers, L.M. and J. Cossman, *Transferrin receptor induction in mitogen-stimulated human T lymphocytes is required for DNA synthesis and cell division and is regulated by interleukin 2*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1983. 80(11): p. 3494-8.
160. Fischer, R., et al., *Regulation of physiological and pathological Th1 and Th2 responses by lactoferrin*. Biochem Cell Biol, 2006. 84(3): p. 303-11.
161. Dorner, M.H., et al., *Ferritin synthesis by human T lymphocytes*. Science, 1980. 209(4460): p. 1019-21.
162. de Sousa, M., et al., *Iron overload in beta 2-microglobulin-deficient mice*. Immunol Lett, 1994. 39(2): p. 105-11.
163. Koller, B.H., et al., *Normal development of mice deficient in beta 2M, MHC class I proteins, and CD8+ T cells*. Science, 1990. 248(4960): p. 1227-30.
164. Feder, J.N., et al., *The discovery of the new haemochromatosis gene*. 1996. J Hepatol, 2003. 38(6): p. 704-9.
165. Levy, J.E., L.K. Montross, and N.C. Andrews, *Genes that modify the hemochromatosis phenotype in mice*. J Clin Invest, 2000. 105(9): p. 1209-16.
166. Santos, M.M., et al., *Iron overload and heart fibrosis in mice deficient for both beta2-microglobulin and Rag1*. Am J Pathol, 2000. 157(6): p. 1883-92.
167. Weinberg, E.D., *Iron availability and infection*. Biochim Biophys Acta, 2009. 1790(7): p. 600-5.
168. Smith, K.D., *Iron metabolism at the host pathogen interface: lipocalin 2 and the pathogen-associated iroA gene cluster*. Int J Biochem Cell Biol, 2007. 39(10): p. 1776-80.
169. Jabado, N., et al., *Iron chelators modulate the fusogenic properties of Salmonella-containing phagosomes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. 100(10): p. 6127-32.
170. Bellamy, R., et al., *Variations in the NRAMP1 gene and susceptibility to tuberculosis in West Africans*. N Engl J Med, 1998. 338(10): p. 640-4.
171. Fleming, M.D., et al., *Nramp2 is mutated in the anemic Belgrade (b) rat: evidence of a role for Nramp2 in endosomal iron transport*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. 95(3): p. 1148-53.
172. Flo, T.H., et al., *Lipocalin 2 mediates an innate immune response to bacterial infection by sequestering iron*. Nature, 2004. 432(7019): p. 917-21.
173. Brinkmann, M., et al., *Expression of iron transport proteins divalent metal transporter-1, Ferroportin-1, HFE and transferrin receptor-1 in human monocyte-derived dendritic cells*. Cell Biochem Funct, 2007. 25(3): p. 287-96.

174. Kramer, J.L., et al., *Differentiation of functional dendritic cells and macrophages from human peripheral blood monocyte precursors is dependent on expression of p21 (WAF1/CIP1) and requires iron*. Br J Haematol, 2002. 117(3): p. 727-34.
175. Aliprantis, A.O., et al., *Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through toll-like receptor-2*. Science, 1999. 285(5428): p. 736-9.
176. Constante, M., et al., *Repression of repulsive guidance molecule C during inflammation is independent of Hfe and involves tumor necrosis factor-alpha*. Am J Pathol, 2007. 170(2): p. 497-504.
177. Werling, D., et al., *Variation matters: TLR structure and species-specific pathogen recognition*. Trends Immunol, 2009. 30(3): p. 124-30.
178. Akira, S., S. Uematsu, and O. Takeuchi, *Pathogen recognition and innate immunity*. Cell, 2006. 124(4): p. 783-801.
179. Iwasaki, A. and R. Medzhitov, *Toll-like receptor control of the adaptive immune responses*. Nat Immunol, 2004. 5(10): p. 987-95.
180. Kanzler, H., et al., *Therapeutic targeting of innate immunity with Toll-like receptor agonists and antagonists*. Nat Med, 2007. 13(5): p. 552-9.
181. Kim, Y.M., et al., *UNC93B1 delivers nucleotide-sensing toll-like receptors to endolysosomes*. Nature, 2008. 452(7184): p. 234-8.
182. Kawai, T. and S. Akira, *The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition*. Int Immunol, 2009. 21(4): p. 317-37.
183. Kawai, T. and S. Akira, *Signaling to NF-kappaB by Toll-like receptors*. Trends Mol Med, 2007. 13(11): p. 460-9.
184. O'Neill, L.A. and C.A. Dinarello, *The IL-1 receptor/toll-like receptor superfamily: crucial receptors for inflammation and host defense*. Immunol Today, 2000. 21(5): p. 206-9.
185. Sandor, F. and M. Buc, *Toll-like receptors. I. Structure, function and their ligands*. Folia Biol (Praha), 2005. 51(5): p. 148-57.
186. O'Neill, L.A., *Immunology. After the toll rush*. Science, 2004. 303(5663): p. 1481-2.
187. Kumar, H., T. Kawai, and S. Akira, *Toll-like receptors and innate immunity*. Biochem Biophys Res Commun, 2009. 388(4): p. 621-5.
188. Kumar, H., T. Kawai, and S. Akira, *Pathogen recognition in the innate immune response*. Biochem J, 2009. 420(1): p. 1-16.
189. Willment, J.A. and G.D. Brown, *C-type lectin receptors in antifungal immunity*. Trends Microbiol, 2008. 16(1): p. 27-32.
190. Murawski, M.R., et al., *Respiratory syncytial virus activates innate immunity through Toll-like receptor 2*. J Virol, 2009. 83(3): p. 1492-500.
191. Medzhitov, R., *Toll-like receptors and innate immunity*. Nat Rev Immunol, 2001. 1(2): p. 135-45.
192. Chalifour, A., et al., *Direct bacterial protein PAMP recognition by human NK cells involves TLRs and triggers alpha-defensin production*. Blood, 2004. 104(6): p. 1778-83.
193. Banerjee, A. and S. Gerondakis, *Coordinating TLR-activated signaling pathways in cells of the immune system*. Immunol Cell Biol, 2007. 85(6): p. 420-4.
194. Nagase, H., et al., *Expression and function of Toll-like receptors in eosinophils: activation by Toll-like receptor 7 ligand*. J Immunol, 2003. 171(8): p. 3977-82.



195. Werling, D., et al., *Role of bovine chemokines produced by dendritic cells in respiratory syncytial virus-induced T cell proliferation*. Vet Immunol Immunopathol, 2002. 87(3-4): p. 225-33.
196. Zaru, R., et al., *The MAPK-activated kinase Rsk controls an acute Toll-like receptor signaling response in dendritic cells and is activated through two distinct pathways*. Nat Immunol, 2007. 8(11): p. 1227-35.
197. Banchereau, J. and R.M. Steinman, *Dendritic cells and the control of immunity*. Nature, 1998. 392(6673): p. 245-52.
198. Banchereau, J., et al., *Immunobiology of dendritic cells*. Annu Rev Immunol, 2000. 18: p. 767-811.
199. Xu, D., H. Liu, and M. Komai-Koma, *Direct and indirect role of Toll-like receptors in T cell mediated immunity*. Cell Mol Immunol, 2004. 1(4): p. 239-46.
200. Pasare, C. and R. Medzhitov, *Control of B-cell responses by Toll-like receptors*. Nature, 2005. 438(7066): p. 364-8.
201. Meyer-Bahlburg, A., S. Khim, and D.J. Rawlings, *B cell intrinsic TLR signals amplify but are not required for humoral immunity*. J Exp Med, 2007. 204(13): p. 3095-101.
202. Akira, S. and K. Takeda, *Toll-like receptor signalling*. Nat Rev Immunol, 2004. 4(7): p. 499-511.
203. Saitoh, S., et al., *Lipid A antagonist, lipid IVa, is distinct from lipid A in interaction with Toll-like receptor 4 (TLR4)-MD-2 and ligand-induced TLR4 oligomerization*. Int Immunol, 2004. 16(7): p. 961-9.
204. Hemmi, H., et al., *Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway*. Nat Immunol, 2002. 3(2): p. 196-200.
205. Poltorak, A., et al., *Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene*. Science, 1998. 282(5396): p. 2085-8.
206. Takeda, K. and S. Akira, *Toll-like receptors in innate immunity*. Int Immunol, 2005. 17(1): p. 1-14.
207. Takeda, K. and S. Akira, *TLR signaling pathways*. Semin Immunol, 2004. 16(1): p. 3-9.
208. Janssens, S. and R. Beyaert, *A universal role for MyD88 in TLR/IL-1R-mediated signaling*. Trends Biochem Sci, 2002. 27(9): p. 474-82.
209. Jones, B.W., et al., *Differential roles of Toll-like receptors in the elicitation of proinflammatory responses by macrophages*. Ann Rheum Dis, 2001. 60 Suppl 3: p. iii6-12.
210. Okada, M. and T. Shirakawa, *[Frontier of mycobacterium research--host vs. mycobacterium]*. Kekkaku, 2005. 80(9): p. 613-29.
211. Romano Carratelli, C., et al., *Toll-like receptor-4 (TLR4) mediates human beta-defensin-2 (HBD-2) induction in response to Chlamydia pneumoniae in mononuclear cells*. FEMS Immunol Med Microbiol, 2009. 57(2): p. 116-24.
212. Funderburg, N., et al., *Human -defensin-3 activates professional antigen-presenting cells via Toll-like receptors 1 and 2*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. 104(47): p. 18631-5.
213. Pham, C.G., et al., *Ferritin heavy chain upregulation by NF-kappaB inhibits TNFalpha-induced apoptosis by suppressing reactive oxygen species*. Cell, 2004. 119(4): p. 529-42.

214. Yamamoto, M., et al., *Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway*. Science, 2003. 301(5633): p. 640-3.
215. Hoebe, K., et al., *Identification of Lps2 as a key transducer of MyD88-independent TIR signalling*. Nature, 2003. 424(6950): p. 743-8.
216. Kawai, T., et al., *Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin*. Immunity, 1999. 11(1): p. 115-22.
217. Oshiumi, H., et al., *TICAM-1, an adaptor molecule that participates in Toll-like receptor 3-mediated interferon-beta induction*. Nat Immunol, 2003. 4(2): p. 161-7.
218. Kawai, T., et al., *Lipopolysaccharide stimulates the MyD88-independent pathway and results in activation of IFN-regulatory factor 3 and the expression of a subset of lipopolysaccharide-inducible genes*. J Immunol, 2001. 167(10): p. 5887-94.
219. Drexler, S.K. and B.M. Foxwell, *The role of Toll-like receptors in chronic inflammation*. Int J Biochem Cell Biol, 2009.
220. Kanczkowski, W., et al., *Pam3CSK4 and LTA-TLRs ligands associated with microdomains induce IL8 production in human adrenocortical cancer cells*. Horm Metab Res, 2007. 39(6): p. 457-60.
221. Rose, W.A., 2nd, C.L. McGowin, and R.B. Pyles, *FSL-1, a bacterial-derived toll-like receptor 2/6 agonist, enhances resistance to experimental HSV-2 infection*. Virol J, 2009. 6(1): p. 195.
222. Ritter, M., et al., *Characterization of Toll-like receptors in primary lung epithelial cells: strong impact of the TLR3 ligand poly(I:C) on the regulation of Toll-like receptors, adaptor proteins and inflammatory response*. J Inflamm (Lond), 2005. 2: p. 16.
223. Lin, W.W. and Y.T. Lee, *Pyrimidinoceptor-mediated activation of phospholipase C and phospholipase A2 in RAW 264.7 macrophages*. Br J Pharmacol, 1996. 119(2): p. 261-8.
224. Janeway, C.A., Jr. and R. Medzhitov, *Innate immune recognition*. Annu Rev Immunol, 2002. 20: p. 197-216.
225. Takeuchi, O., K. Hoshino, and S. Akira, *Cutting edge: TLR2-deficient and MyD88-deficient mice are highly susceptible to Staphylococcus aureus infection*. J Immunol, 2000. 165(10): p. 5392-6.
226. Tsukamoto, H., *Iron regulation of hepatic macrophage TNFalpha expression*. Free Radic Biol Med, 2002. 32(4): p. 309-13.